

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

DE L'IMMUNISATION CONTRE LE SARCOME DE LA SOURIS PAR LA VOIE INTRACUTANÉE

Par A. BESREDKA et L. GROSS.

Un des arguments que l'on invoque contre la nature microbienne des tumeurs est la faculté attribuée à certains tissus de conférer l'immunité non spécifique contre ces tumeurs. Cette assertion, que l'on trouve chez la plupart des auteurs qui se sont occupés du cancer expérimental, a de l'importance propre, indépendamment des conclusions que l'on peut en tirer sur la nature des tumeurs.

Lorsqu'on examine de près les nombreuses publications consacrées à ce sujet, on est d'abord confondu des contradictions qui séparent les auteurs. Ainsi, Jensen, Ehrlich, Michaelis et d'autres ont déclaré que les souris, qui restent indemnes à la suite de l'inoculation de la tumeur sous la peau, deviennent réfractaires à la réinoculation de doses massives de cette même tumeur. Ni Bridré, ni Nather et Schnitzler, ni Urbach n'ont jamais pu le confirmer. N'a-t-on pas vu Bashford s'élever avec la dernière énergie contre l'affirmation de Lewin soutenant que l'on pouvait immuniser des animaux avec des tumeurs provenant d'espèces étrangères? Apolant et Marx n'ont-ils pas démenti les expériences de Bashford et Woglom, d'après les-

quelles les souris se laissent immuniser par leur propre rate, réinjectée sous la peau, etc. ?

Il y a cependant des faits au sujet desquels la plupart des auteurs semblent être d'accord : nous avons en vue l'immunité que confère l'injection d'organes ou de tissu embryonnaire d'animaux normaux. Cette immunité est-elle de même ordre que celle, spécifique, que nous apprit l'étude des maladies infectieuses.

*
* *

Parmi les recherches consacrées à cette question, les plus importantes sont celles de Bridré, puis celles de Schöne, élève d'Ehrlich. Au cours de ses nombreuses expériences, Bridré a constaté que des souris auxquelles on injecte préalablement une émulsion de rate normale, acquièrent une immunité à l'égard du carcinome introduit sous la peau. Ainsi, dans une de ces expériences, 8 souris ainsi préparées demeurèrent, toutes, réfractaires à l'inoculation de la tumeur ; mais, dans cette même expérience, sur 20 souris témoins, 9 restèrent également indemnes. La tumeur était évidemment, à l'époque (1912), relativement peu virulente, ce qui expliquerait ces résultats. La même remarque s'applique aux expériences de Schöne qui a observé des faits d'immunité, surtout à la suite d'injections de tissu embryonnaire. Notons que dans nos propres expériences, qui ont porté cependant sur une tumeur très virulente, des faits analogues à ceux observés par Bridré et Schöne ont été constatés dans quelques cas isolés ; mais, comme nous allons le voir, ces cas sont rares et on ne saurait les faire entrer dans le cadre de l'immunité spécifique.

Avant de passer à l'exposé de nos expériences, nous devons mentionner celles de Collier, parues tout récemment qui méritent que l'on s'y arrête.

Collier a expérimenté sur du liquide d'ascite provenant des souris atteintes de carcinome expérimental. Ce liquide, injecté à faible dose dans le péritoine, tuait des souris dans 100 p. 100 des cas. Or, que les souris fussent préparées avec des produits d'origine étrangère (sérum humain ou de cheval) ou avec des cellules homologues (rate, foie, rein, cerveau de la souris), elles ne résistaient pas plus à l'inoculation du liquide d'ascite

que les souris neuves, et cela aussi bien dans les cas où cette inoculation avait été faite dans le péritoine ou sous la peau. Il en fut de même chez les souris qui avaient été préparées antérieurement avec de l'adénocarcinome peu virulent d'Ehrlich : éprouvées ensuite dans le péritoine avec du liquide d'ascite, les souris ainsi préparées mouraient, sans exception, de péritonite cancéreuse, comme les témoins.

IMMUNITÉ NON SPÉCIFIQUE.

Passons à nos propres expériences. En présence de l'opinion, aujourd'hui fort répandue, quant au pouvoir protecteur exercé par l'injection d'organes normaux, nous avons tenu à reprendre ces expériences sur une grande échelle, en faisant varier les voies de pénétration des organes, ainsi que celles des tumeurs. Des recherches de nos prédécesseurs, il ressort que c'est surtout au tissu embryonnaire qu'appartient le pouvoir protecteur ; aussi, c'est dans ce sens principalement qu'ont été dirigées la plupart de nos expériences. En voici quelques exemples :

EXPÉRIENCE 1. — Le 13 février, 4 souris reçoivent *dans la peau* une émulsion chargée d'organes normaux de souris (rate, foie, reins). Le 18 février, on inocule à ces souris, ainsi qu'à 3 témoins, de la tumeur sarcomateuse *sous la peau*. Tous ces animaux présentent des sarcomes sous-cutanés, et ils meurent entre le 6 mars et le 27 avril.

EXPÉRIENCE 2. — Le 4 mars, 6 souris reçoivent *dans le péritoine* une émulsion chargée d'organes (foie, rate, reins). Le 20 mars, on leur inocule une émulsion sarcomateuse (0 c. c. 25 à 20 p. 100) dans le péritoine. Toutes ces souris, ainsi que leurs témoins, au nombre de 5, présentent une sarcomatose péritonéale typique, avec du liquide d'ascite sanguinolent, à laquelle elles succombent dans les deux semaines qui suivent.

EXPÉRIENCE 3. — Le 6 avril, on injecte à 14 souris *dans la peau* du tissu embryonnaire. Le 10 avril, on divise ces souris en deux lots : aux unes, on inocule du sarcome (0 c. c. 2 d'émulsion à 20 p. 100) *dans la peau* ; aux autres, on inocule 0 c. c. 25 de cette même émulsion *sous la peau*. Des inoculations semblables sont faites, dans chaque lot, à un nombre égal de témoins. Dans les sept jours qui suivent, on constate des tumeurs chez toutes les souris. Nous avons eu cependant l'impression que chez les souris du premier lot, c'est-à-dire préparées dans la peau, puis inoculées dans la peau, les tumeurs apparaissent plus tardivement que chez leurs témoins, tout en évoluant dans la suite aussi rapidement que chez ces derniers.

EXPÉRIENCE 4. — Le 6 avril, on injecte à 7 souris *dans la peau* du tissu embryonnaire. Le 10 avril, on leur inocule, ainsi qu'à 7 souris témoins, 0 c. c. 25

d'une émulsion sarcomateuse à 20 p. 100 *dans le péritoine*. Sur les 7 témoins, 6 sont mortes avec les symptômes de péritonite sarcomateuse dans les quinze jours ; la septième a été sacrifiée le 26 avril ; elle était pleine et ne présentait pas de tumeurs visibles. Sur les 7 souris préparées, 5 sont mortes dans les quinze jours de péritonite sarcomateuse ; 2 autres ont été sacrifiées le 3 mai : l'une d'elles était mourante, elle avait de l'ascite et des tumeurs sarcomateuses en grand nombre ; chez l'autre, nous n'avons constaté qu'une seule tumeur du volume d'un petit haricot au niveau du mésentère.

Il semble donc que, à la suite de l'injection du tissu embryonnaire dans la peau, la cavité péritonéale est susceptible d'accuser un certain degré de résistance.

EXPÉRIENCE 5. — Le 12 avril, on injecte à 4 souris du tissu embryonnaire *sous la peau*. Le 16 avril, on les éprouve en leur inoculant de l'émulsion sarcomateuse *sous la peau*. 5 souris neuves sont inoculées de même. Dans la suite, les tumeurs évoluent d'une façon identique chez tous ces animaux.

EXPÉRIENCE 6. — Le 12 avril, on injecte à 8 souris *dans la peau* une émulsion préparée avec du tissu cutané de souris. Le 16 avril, on les divise en deux lots : à 3 souris, on inocule du sarcome (0 c. c. 2 à 20 p. 100) *dans la peau* ; à 5 souris, on inocule du sarcome (0 c. c. 25 à 20 p. 100) *sous la peau*. Toutes ces souris, ainsi que leurs témoins respectifs, inoculés en nombre égal, présentent des tumeurs dans les conditions sensiblement identiques. Les mêmes faits ont été décrits par Urbach.

Dans d'autres expériences, au lieu de préparer les animaux avec des organes d'animaux normaux, nous avons employé des émulsions de tumeurs. Nous avons essayé d'abord des tumeurs rendues avirulentes par un séjour *in vitro* pendant trois jours à la température du laboratoire ou par l'agitation en présence de billes de verre pendant deux heures et demie. Les souris ainsi préparées avec des émulsions chargées de tumeur par la voie sous- ou intracutanée furent éprouvées dans la suite avec du sarcome virulent *sous la peau* ou *dans la peau* : elles ont réagi exactement comme les témoins.

Les résultats n'ont pas été plus favorables dans les cas où les souris avaient été préparées avec une émulsion d'un adénocarcinome spontané avirulent, excisé chez une souris âgée, comme en témoigne l'expérience suivante :

Le 8 février, on injecte une émulsion chargée d'adénocarcinome à 5 souris *sous la peau* et à 5 autres souris *dans la peau*. Le 27 février, les 10 souris et autant de témoins sont inoculées avec une dose mortelle de sarcome par la voie sous-cutanée. Dans la suite, aucune différence n'a pu être constatée entre es souris préparées et les témoins. Dans d'autres expériences semblables, où nous avons fait varier les intervalles jusqu'à trois mois, entre l'injection préparante et celle d'épreuve, les résultats étaient les mêmes.

Nous nous sommes demandé si on ne saurait immuniser les souris avec des émulsions de sarcome, injectées à doses sub-mortelles. Les imperfections du dosage, inhérentes surtout à la virulence inégale des tumeurs, ont nécessité des expériences multiples. Dans certaines séries, une dose minime (0 c. c. 4 d'une émulsion à 1 : 1.000 et même à 1 : 10.000) injectée dans la peau suffisaient pour donner naissance à une tumeur, chez 5 souris sur 9, ou chez 3 seulement 5 ; dans d'autres séries, une dose plus forte (0 c. c. 10 d'une émulsion à 10 p. 100) ne produisait de tumeur que chez 2 souris sur 10. Il était donc difficile, dès qu'on s'écartait de la dose sûrement mortelle (0 c. c. 3 d'une émulsion à 10 p. 100, soit 0 gr. 03), d'établir celle qui s'en rapprochait le plus. Nous avons pu cependant nous rendre compte, par de nombreuses expériences, que chaque fois que l'on injectait une dose qui nous paraissait convenable, mais qui ne donnait pas naissance à une tumeur, les souris étaient incapables de résister dans la suite à une dose mortelle de sarcome.

En voici une de ces expériences :

Le 26 février, 10 souris sont injectées dans la peau (0 c. c. 10 d'une émulsion sarcomateuse à 10 p. 100). Une seule de ces souris présente une tumeur intracutanée dans les trois semaines qui suivent. Les 9 autres restent indemnes.

7 de ces souris sont réinoculées dans la peau le 23 mars (0 c. c. 2 d'une émulsion à 20 p. 100). Chez toutes les souris, comme chez les témoins (6), on voit apparaître, dans les huit jours qui suivent, des tumeurs intracutanées caractéristiques.

Nous nous croyons donc autorisés à conclure de ces expériences et d'autres semblables, qui avaient porté sur des centaines de souris, qu'aucun des tissus examinés ne protège contre notre sarcome virulent, quelle que soit la voie d'injection employée : ni l'émulsion d'organes ou de tissu embryonnaire, ni l'émulsion de tumeur sarcomateuse rendue artificiellement avirulente, ni l'émulsion d'adénocarcinome naturellement avirulent, ni notre propre sarcome, injecté à des doses qui ne donnent pas de tumeur, ne confèrent l'immunité à la souris.

IMMUNITÉ SPÉCIFIQUE.

La question qui se posa ensuite était de savoir si la souris se prêtait à l'immunisation par d'autres moyens que ceux que nous venons d'énumérer.

Rappelons que, depuis les expériences de Lewin, on sait que chez les rats auxquels on inocule du carcinome sous la peau, on observe, dans un petit nombre de cas (10 p. 100 environ), une résorption spontanée de la tumeur, suivie d'un état réfractaire à la réinoculation de la même tumeur. Le même phénomène a été observé antérieurement chez les chiens sarcomateux par Stricker, ainsi que chez les souris carcinomateuses par Clowes.

Pour ce qui est du sarcome d'Ehrlich des souris, sur lequel ont porté nos expériences, une telle résorption spontanée des tumeurs sous-cutanées n'a pas été observée. Or, comme nous allons le montrer, les souris se prêtent à l'immunisation active, à la condition que l'on choisisse une porte d'entrée convenable.

Le rôle capital de la porte d'entrée, en vue de la vaccination, a été déjà mis en lumière par l'un de nous. Ainsi, dans les maladies qui sont caractérisées par la prédominance des troubles intestinaux, telles que la dysenterie, le choléra, la fièvre typhoïde, la coli-bacilliose, pour ne citer que celles qui sont le plus fréquemment rencontrées, c'est la voie buccale qui est la porte d'entrée de prédilection pour créer l'immunité. Dans les infections où les symptômes cutanés occupent l'avant-scène, telles que les staphylococcies, les streptococcies ou le charbon, c'est la vaccination par la voie cutanée qui fournit les résultats les meilleurs : les expériences ont montré que, dans ce dernier groupe de maladies, la cuti-vaccination est notablement supérieure à la vaccination par la voie sous-cutanée et, en ce qui concerne le charbon, on connaît les services que ce nouveau procédé de vaccination rend aujourd'hui dans l'économie rurale.

Or, l'affection sarcomateuse rappelle par certains côtés, notamment par son affinité élective pour la peau, l'infection charbonneuse. Aussi nous sommes-nous demandé si l'on ne saurait réussir, à la faveur de la cuti-vaccination, là où les procédés jusqu'ici employés ont échoué. Les expériences

instituées dans cet ordre d'idées ont justifié nos prévisions.

En effet, en introduisant dans la peau de petites quantités de virus sarcomateux, juste suffisantes pour produire une tumeur susceptible de régresser, comme cela a été décrit précédemment (1), on réalise une cuti-vaccination conférant l'immunité à l'animal tout entier.

Rappelons, avant de passer à l'exposé de nos expériences, que les injections dans la peau ont été pratiquées, pour des considérations différentes des nôtres, par Knopf, puis par Urbach. Knopf a opéré sur des rats auxquels il a introduit, dans la peau, du carcinome au moyen d'un trocart. Il résulte de ses expériences qu'à la suite de cette préparation, quelquefois les tumeurs ne se développent pas; chez les témoins aussi, les inoculations demeurent négatives dans 30 à même dans 50 p. 100 des cas. Remarquons, du reste, que ces fragments de carcinome qui sont insérés dans la peau, ne sont pas suivis d'un développement de véritables tumeurs.

Urbach a observé chez des souris, dans certains cas, la non apparition des tumeurs à la suite de l'injection dans la peau d'émulsions de peau ayant été irradiée avec des rayons de Roentgen.

*
* *

Voici, pour fixer les idées, quelques-unes de nos expériences de vaccination, choisies parmi beaucoup d'autres semblables :

EXPÉRIENCE 1. — 4 souris sont inoculées *dans la peau* le 4 janvier. Les tumeurs apparaissent le 12 janvier. Celles-ci ont complètement disparu le 2 février; on procède alors à une deuxième inoculation *dans la peau*. Le résultat est négatif. Le 13 février, on procède à une troisième inoculation *dans la peau*, en deux points différents : le résultat reste négatif.

En même temps, c'est-à-dire le 13 février, on inocule 10 souris témoins dans la peau, dans les mêmes conditions; sur les 10 souris, 9 présentent, dès le 19 février, des tumeurs en pleine évolution.

EXPÉRIENCE 2. — 5 souris sont injectées *dans la peau* le 16 janvier; les tumeurs intracutanées ont apparu vers la fin du mois et ont disparu entre le 3 et 7 février. Le 8 février, on procède à l'inoculation *sous la peau*. Aucune de ces souris cuti-vaccinées ne présente de tumeur, alors que 10 souris témoins, inoculées dans les mêmes conditions, présentent, toutes, dès le 15 février, des tumeurs caractéristiques.

EXPÉRIENCE 3. — Le 15 janvier, sur 6 souris inoculées *dans la peau*, les tumeurs intracutanées font leur apparition vers le 22 janvier; elles se sont

(1) Ces *Annales*, t. 33, octobre 1933; p. 402.

résorbées chez 3 d'entre elles le 10 février. Le 1^{er} mars, on inocule *dans le péritoine* de ces dernières 0 c. c. 25 d'une émulsion sarcomateuse à 20 p. 100. Les 3 souris préparées demeurent saines ; 3 souris témoins, inoculées dans les mêmes conditions, succombent, dans les vingt jours, à une sarcomatose péritonéale généralisée.

EXPÉRIENCE 4. — 4 souris sont inoculées *dans la peau* le 25 janvier, le 4 février et le 8 février. Les tumeurs intracutanées ont apparu une semaine après, puis elles ont disparu complètement vers la fin du mois de février. Le 20 mars, on injecte à ces 4 souris, ainsi qu'à 6 témoins, dans le péritoine, 0 c. c. 15 d'une émulsion sarcomateuse à 15 p. 100. Les 6 témoins sont mortes dans les onze jours d'une sarcomatose généralisée du péritoine. Sur les 3 souris préparées, 1 est morte le 5 avril d'une infection secondaire : elle ne présentait pas, à l'autopsie, aucune trace de tumeur ; les 3 autres survécurent définitivement.

De ces expériences, il résulte qu'en empruntant la voie intracutanée, on réussit à obtenir l'immunité antisarcomateuse, aussi bien chez les souris inoculées dans la peau ou sous la peau que chez celles inoculées dans le péritoine. Toutefois, nous tenons à faire remarquer que l'épreuve par la voie sous-cutanée semble notablement plus sévère que par la voie intracutanée ou intrapéritonéale.

IMMUNISATION PAR LA VOIE CUTANÉE AVEC LE SARCOME S.37.

En partant d'un poids déterminé du sarcome S.37, qui par certains détails histologiques diffère du sarcome d'Ehrlich, nous avons obtenu, après broyage dans les conditions déjà indiquées plus haut et après filtration sur toile, une émulsion qui nous a servi à injecter des souris. Nous avons pu constater que les deux sarcomes, celui d'Ehrlich et le S.37, présentent une virulence sensiblement égale ; les tumeurs apparaissent au bout d'un délai à peu près le même, leur évolution ne diffère pas sensiblement dans les deux cas et elles tuent les animaux à peu près en même temps.

Tout comme dans le cas de sarcome d'Ehrlich, chez les souris auxquelles on injecte le sarcome S.37 *dans la peau*, on voit apparaître des tumeurs qui augmentent progressivement jusqu'à la mort lorsque la dose d'émulsion injectée est massive ; lorsque cette dose est faible, la tumeur intracutanée se développe pendant quelque temps, atteint les dimensions d'un pois ou d'un grain de café, puis régresse pour disparaître com-

plètement. Comme dans les cas de sarcome d'Ehrlich, les souris, chez lesquelles la tumeur intracutanée a complètement disparu, se montrent immunisées vis-à-vis d'une inoculation intracutanée ultérieure de la même tumeur. De même, les souris qui n'avaient pas réagi à la première injection intracutanée se comportent ultérieurement comme des souris neuves.

Pour nous résumer : à la condition que la vaccination soit faite strictement dans la peau, à une dose susceptible de régresser, et que l'épreuve soit faite après que la tumeur intracutanée ait complètement disparu, on réalise chez la souris une immunité anti-sarcomateuse solide et spécifique.

CONCLUSIONS.

L'injection préalable d'émulsion d'organes normaux est capable dans un certain nombre de cas de protéger la souris contre le sarcome, mais ce pouvoir protecteur n'existe pas lorsqu'on est en présence d'une souche très virulente.

Ni l'émulsion d'organes ou de tissu embryonnaire, ni l'émulsion de tumeurs avirulentes ou rendues telles artificiellement, ni l'émulsion de sarcome virulent injecté en quantité insuffisante, ne sont capables de vacciner la souris contre le sarcome virulent, quelle que soit la voie d'introduction de ce dernier ou celle des émulsions en question.

On réalise chez la souris une immunité anti-sarcomateuse spécifique, en préparant la peau au moyen d'une quantité de sarcome faible, mais suffisante pour produire une tumeur intracutanée résorbable.

BIBLIOGRAPHIE

- JENSEN, *Zentralbl. f. Bakteriolog.*, 34, 1903, p. 28, 122.
 EHRLICH et APOLANT, *Berlin. klin. Woch.*, 1905, p. 871 ; *Zeitschr. f. Krebsf.*, 5, 1907, p. 59.
 EHRLICH, APOLANT et HAALAND, *Berlin. klin. Woch.*, 1906, p. 871.
 MICHAELIS, *Zeitschr. f. Krebsf.*, 4, 1906, p. 1 ; 5, 1907, p. 189, 191.
 BRIDRÉ, *Ces Annales*, 1907, p. 760.
 NATHER, *Zeitschr. f. Krebsf.*, 1922, p. 119.
 NATHER et SCHNITZLER, *Wien. klin. Woch.*, 1926, p. 1384.
 URBACH et SCHMIDT, *Wien. klin. Woch.*, n° 27, 1928.

URBACH, *Mediz. Klinik*, n° 22, 1933.

LEWIN, *Zeitschr. f. Krebsf.*, 6, 1908, p. 267. Voir aussi *Die Aetiologie der bösartigen Geschwülste*. Springer, édit. Berlin, 1928.

BASHFORD et WOGLOM, *Zeitschr. f. Krebsf.*, 11, 1912, p. 97. (Cité d'après Apollant).

SCHÖNE, *Münchener mediz. Woch.*, 1906, p. 2517.

COLLIER, *Zeitschr. f. Krebsf.*, 1934, p. 303, 317.

STRICKER, *Zeitschr. f. Krebsf.*, 1, 1904, p. 413.

KNOFF, *Zeitschr. f. Krebsf.*, 25, 1927, p. 64.

UHLENHUTH et SEIFFERT, *Mediz. Klin.*, 1925, p. 578, 620.

BLUMENTHAL, *Ergebnisse der experimentellen Krebsforschung*, Leiden, 1934.

LEUCOSE ET SARCOMATOSE DES POULES UNITÉ DE VIRUS

par JEAN TROISIER avec la collaboration de J. SIFFERLEN.

Dans un mémoire sur la sarcomatose des poules (1), nous avons montré que l'inoculation du sarcome fuso-cellulaire pouvait provoquer la mort de la poule en pleine leucémie sans aucune lésion sarcomateuse. Inversement, l'inoculation de sang ou de foie leucémique s'est montrée, entre nos mains, génératrice d'une sarcomatose sans altérations leucosiques du sang.

Depuis nous avons poursuivi nos travaux sur cette question qui passionne à l'heure actuelle tous ceux qui s'intéressent aux rapports des leucémies et des cancers (1). Nous donnerons ici tout d'abord nos documents personnels; puis nous les confronterons avec ceux qui ont été apportés récemment par différents auteurs et nous verrons à quelles conclusions nous avons été amenés.

*
* *

Rappelons, tout d'abord, nos premiers documents.

I. — Le 10 avril 1929, nous inoculons dans le pectoral d'une poule (A18), le foie leucémique d'une autre poule envoyée d'Orléans à M. Truche (2) [souche « Naudin »].

Le diagnostic de leucose était évident à l'examen histologique des coupes du foie (protocole 908) : dans les vaisseaux sanguins du parenchyme hépatique se voient en masse des cellules leucémiques rondes ou ovalisées avec noyau clair. L'infiltrat leucémique siège également en dehors des vaisseaux et forme des traînées cellulaires annexées aux travées hépatiques.

(1) Dans ce travail, nous laissons de côté les rapports avec les épithéliomas. Nous renvoyons à notre mémoire sur la sarcomatose spontanée des poules (1).

(2) Nous remercions vivement M. Truche qui nous a fait parvenir ces poules. Sans sa précieuse collaboration, ce travail n'aurait pu être exécuté.

La poule A18 meurt de cachexie six mois et demi après l'inoculation (28 octobre 1929). Au voisinage de l'injection, mais à une distance notable, 1 centimètre environ, nous trouvons une tumeur dure, isolée, de 3 centimètres sur 2 cent. 1/2, paraissant adhérer à une côte.

Histologiquement (protocole 921), c'est un ostéo-chondrosarcome. Au centre, on trouve une masse chondroïde contenant des cellules du type cartilagineux. On note même deux canaux de Havers. A la périphérie, le reste de la tumeur est constitué par des nodules arrondis, de sarcome fuso-cellulaire dense avec quelques cellules monstrueuses.

L'examen du sang du cadavre révèle, de plus, une leucoérythroblastose évidente avec chute des polynucléaires éosinophiles comme dans les leucémies (14 p. 100). Les érythroblastes sont au nombre de 29 pour 100 leucocytes.

Un deuxième passage (coq A30) est pratiqué avec la tumeur. Au bout d'un mois le greffon avait augmenté de volume, adhérerait aux plans profonds. Mais, ultérieurement, la tumeur régresse et l'animal meurt cachectique, sans leucémie et sans tumeur (12 janvier 1930).

En résumé, poule atteinte de leucose. Le passage donne au voisinage du point d'inoculation un ostéo-chondrosarcome associé à une leucoérythroblastose sanguine. Le passage de cette tumeur ne réussit que temporairement.

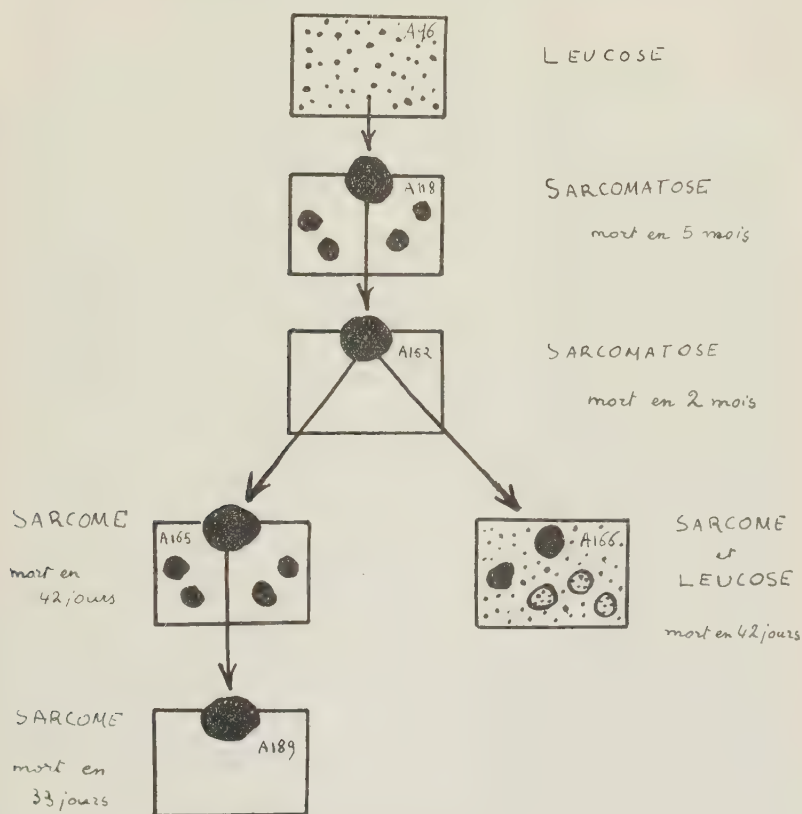
II. — Le 15 janvier 1932, inoculation dans le pectoral d'une poule d'un sarcome fuso-cellulaire provenant d'une autre poule (souche « Clamart »).

Il s'agissait d'une tumeur mésentérique paraissant primitive. L'histologie (protocole 1078) montrait un sarcome fuso-cellulaire avec de gros vaisseaux distendus et des hémorragies massives. L'étude du foie ne permet pas de déceler de métastases ni d'état leucémique.

La poule inoculée A62 meurt en deux mois. L'autopsie permet de retrouver vaguement le greffon au milieu de vastes hémorragies. L'histologie (protocole 2004 du 18 mars 1932) permet, non sans difficulté, de retrouver au niveau de l'inoculation un rappel de la structure du sarcome de Rous, mais il n'y a aucune prolifération du greffon.

L'étude du sang et d'un fragment du foie fait porter le diag-

nostic de leucémie : les cellules hépatiques sont amincies par la réplétion des sinusoides par de nombreuses cellules leucémiques mononuclées. On retrouve dans les poumons ce même infiltrat de cellules mononuclées sans néoproduction sarcomateuse. Les passages échouent.



SCHEMA 1. Souche n° 3.

En résumé, sarcome fuso-cellulaire. Inoculation à une poule. Pas de prolifération du greffon. Mort en deux mois de leucose.

III. — Le 21 juin 1933, nous inoculons dans la veine d'un coq (A118) 6 cent. cubes de sang leucémique de poule.

Il s'agit d'une poule envoyée par le Dr Médinsky (A96) atteinte de leucémie spontanée (97.000 globules blancs, 805.000 globules rouges; 60 érythroblastes polychromato-

philes pour 100 globules blancs; 25 hémocyto blasts pour 100 leucocytes).

Le coq inoculé avec ce sang leucémique meurt cinq mois après (24 novembre 1933) de sarcomatose généralisée. On trouve à la nécropsie de multiples tumeurs du péritoine et une grosse tumeur près du bréchet, non loin de l'inoculation intra-veineuse axillaire. Une métastase cardiaque. L'histologie (protocole 2.141) donne un sarcome type Pous avec aspect fusocellulaire, avec zones claires mucoïdes, zones vasculaires à sinusoides et quelques zones fibreuses. Elle révèle dans le poumon une métastase débutante, de 100 μ de diamètre, du type fusocellulaire.

Par contre, l'examen du sang de ce coq (A118), pendant la vie et après la mort, ne révèle aucune leuco-érythroblastose. La moelle osseuse du fémur, rouge, contient simultanément érythroblastes, hématies normales, myélocytes variés et leucocytes éosinophiles adultes normaux. Le foie et la rate, de volume normal, viennent souligner qu'il n'y a pas trace, chez ce coq, de processus leucosique en évolution.

A partir de ce coq, nous obtenons une *première série* de passages. Sur 4 poulets inoculés, 3 deviennent sarcomateux et meurent au bout de deux mois à deux mois et demi (A149, A150 et A152, ce dernier après filtration de la tumeur sur L1).

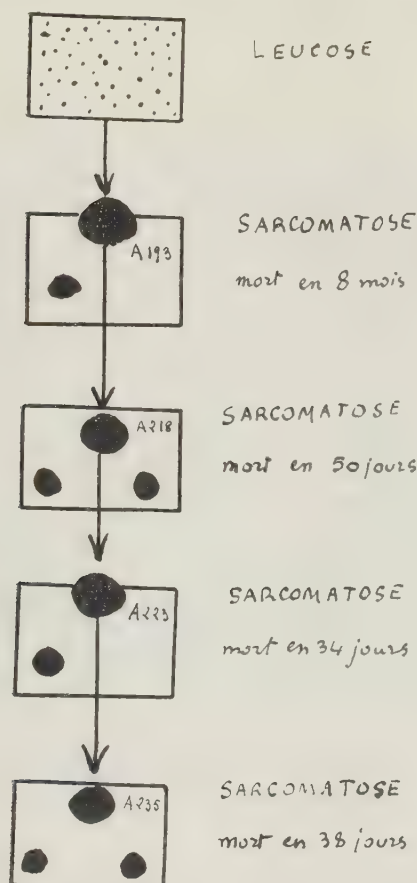
Une *deuxième série* de passages est obtenue: En partant de A149, nous provoquons deux sarcomes fusocellulaires sur deux poules. De même avec A152, nous provoquons 3 sarcomes (mortels en moins de deux mois) [A166, A165, A168, ces derniers après filtrat sur L1].

Un *troisième passage* réussit sur deux poules [mort en un mois et un mois et demi (A189, greffon; A191, filtrat L1)], mais échoue après dessiccation du sarcome (A196).

Six pigeons inoculés dans les deux dernières séries restent indemnes ainsi que deux canards.

Le fait capital à relever, c'est qu'alors que la première série de passages ne montrait aucune leucémie classique, par contre, la deuxième série (soit le troisième passage en venant de la poule A96 leucémique) et la troisième série donnaient sur 5 poules une légère érythroblastose polychromatophile du

sang. L'une de ces poules (A 166, protocole histologique 2.480) révélait, en plus de la tumeur d'inoculation sarcomateuse typique, mais pas développée, une infiltration du foie par des cellules à noyau très clair, à nucléole volumineux :



SCHEMA II. Souche n° 4.

des cellules leucémiques typiques ! De même l'ovaire et le poumon présentaient des tumeurs leucosiques volumineuses, preuve indiscutable de la reviviscence du processus leucémique malgré deux passages exclusivement sarcomateux. Le passage à la poule A 187 reste malheureusement négatif.

En résumé : Inoculation intraveineuse du sang d'une poule

atteinte de leucémie. Mort en cinq mois d'une sarcomatose généralisée, transmissible à trois passages ultérieurs sous forme de sarcome. Une poule sarcomateuse au troisième passage présente simultanément des lésions leucosiques des viscères avec une érythroblastose sanguine. Virus filtrable.

IV. — Une dernière série d'expériences, avec une nouvelle souche, allait se révéler encore plus démonstrative.

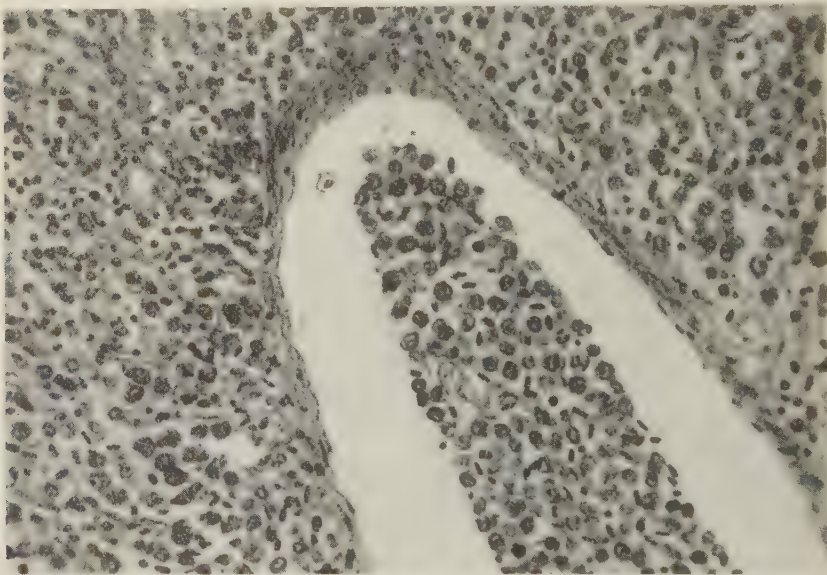


FIG. 1. — Foie de poule (souche 4). Leucose intravasculaire. (Protocole histologique 2.186 B, 22 mars 1934). Le foie de cette poule est inoculé dans le pectoral de la poule A 193 (voy. fig. 2). Photomicrographie Jeantet. Grossissement 1 p. 410.

Le 22 mars 1934, nous inoculons dans le pectoral d'une poule (A193) 8 cent. cubes d'un broyage de foies et de rate leucémiques. Le matériel utilisé provenait de deux poules du même élevage (« Vilcot » à Etiolles, Seine-et-Oise); le foie de l'une pesait 305 grammes; le foie de l'autre 125 grammes et était accompagné d'une rate de 45 grammes (1). Ces trois organes ayant été envoyés à M. Truche sans être isolés les uns

(1) Rappelons que le foie des poules pèse à l'état normal de 30 à 50 grammes; le poids de la rate oscille entre 2 et 3 grammes.

des autres, nous nous étions décidés à en effectuer un broyage commun et à en inoculer l'émulsion à la même poule.

L'examen histologique de ces organes montrait pour tous trois un processus leucosique très marqué.

Pour l'une des poules (foie 125 grammes, rate 15 grammes), il s'agissait d'une leucose intravasculaire, comme le montre la

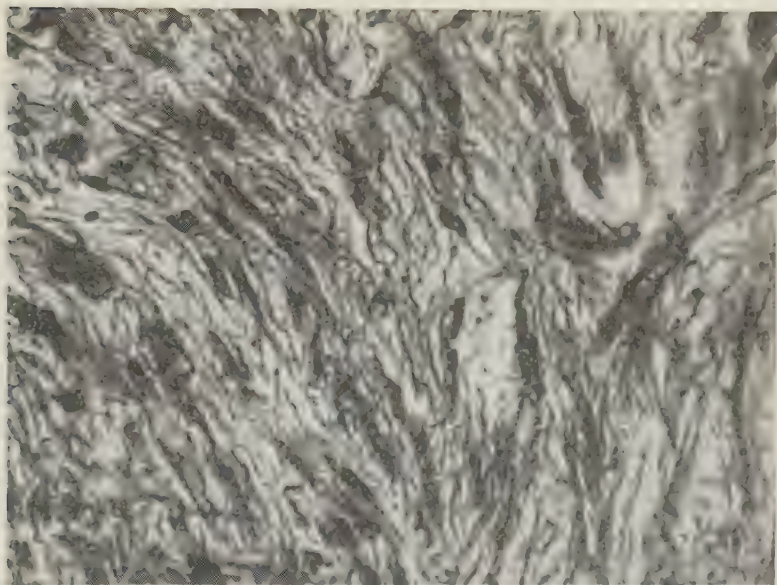


Fig. 2. — Tumeur développée dans le muscle pectoral au point d'inoculation du foie leucémique de la figure 1. Sarcome fuso-cellulaire. (Poule A.193, protocole histologique 2.258. Biopsie du 27 octobre 1934.) Photomicrographie Jeantet. Grossissement 1 p. 400. Souche n° 4.

photomicrographie ci-jointe de Jeantet (fig. 1). Les vaisseaux du foie et de la rate sont littéralement bourrés de cellules mononucléées de type varié. Leur noyau est volumineux, clair, avec un réticulum peu dense et un nucléole volumineux. Le protoplasme basophile est en général peu abondant. C'est à peine si, çà et là, on peut retrouver quelques cellules hépatiques qui permettraient à l'observateur de reconnaître l'organe (protocole 2.186 B). Pour l'autre poule (foie 305 grammes), il s'agit d'une leucose extravasculaire; le sang contenu dans les vaisseaux est parfaitement normal. Il y a seulement une accumu-

lation dans le parenchyme hépatique de cellules mononucléées du même type que précédemment.

La poule inoculée (A193) ne présente tout d'abord aucun symptôme anormal dans la région pectorale. Quatre mois après l'injection intramusculaire, la palpation ne permet de révéler aucune induration suspecte. Ce n'est qu'à la fin du sixième mois que l'on commence à percevoir une tuméfaction profonde au

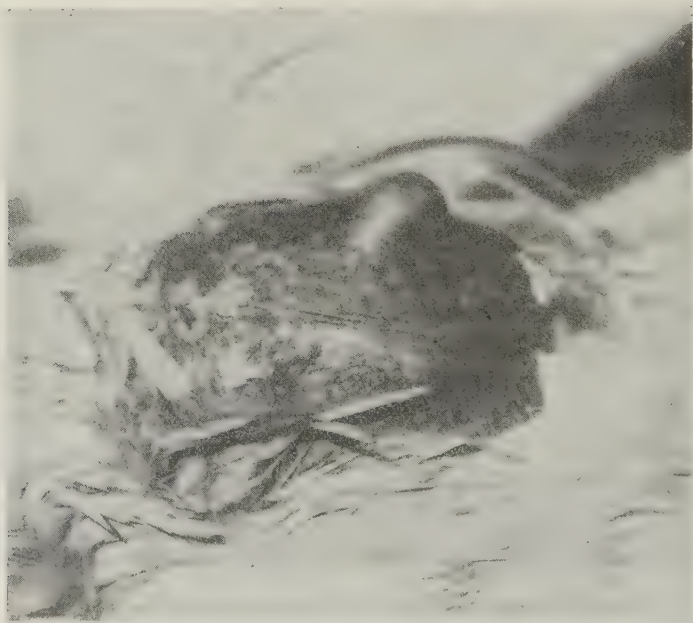


FIG. 3. — Tumeur d'inoculation. Sarcome fuso-cellulaire. (Protocole histologique n° 2.303, 29 janvier 1935.) Poule A.216. Photographie Jeantet.

niveau de la zone inoculée; l'hémogramme reste normal. Une large biopsie, pratiquée le 27 octobre 1934, huit mois après l'inoculation, révèle un sarcome fuso-cellulaire typique, avec zones pseudo-myxomateuses, fibreuses et vascularisées, comme le montre l'excellente photomicrographie que nous devons encore à Jeantet (histo 2.256). La poule meurt quelques jours après (3 décembre 1934). La nécropsie confirme la présence d'une tumeur infiltrant le pectoral, s'arrêtant au niveau du bréchet et ne gagnant point les plans profonds. Plusieurs

métastases infiltrent le tissu pulmonaire. Leur formule histologique (protocole 2.258) est celle du sarcome fuso-cellulaire typique sans image leucosique quelconque.

La tumeur de cette poule A193 nous sert à faire une première série de passages à 3 poules (A216 et A217 avec la biopsie, A218 à l'autopsie). Deux d'entre elles, A216 et A218 moururent rapidement de sarcomatose, l'une en soixante-trois jours avec une tumeur au point d'inoculation (photographie

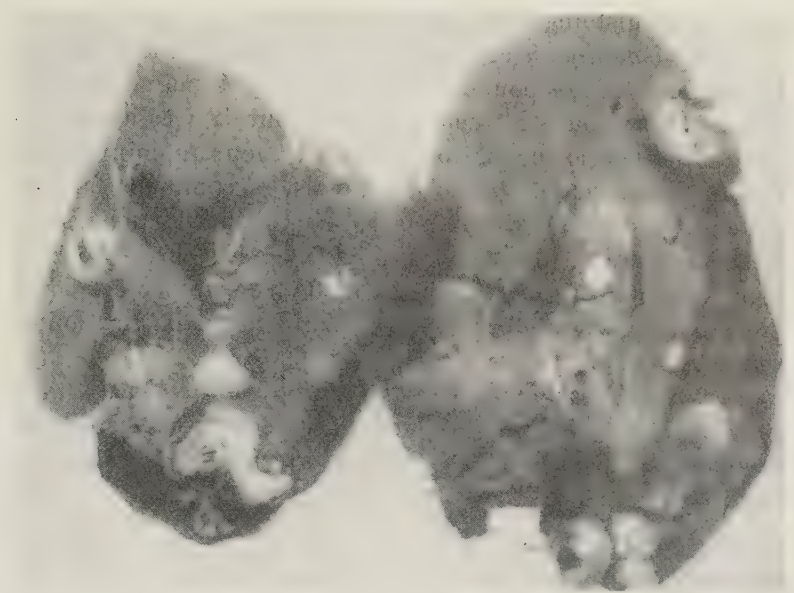


FIG. 4 — Métastases hépatiques. Sarcome fuso-cellulaire. (Protocole histologique 2.363, 12 juin 1935.) Poule A.235. Photographie Jeantet.

figure 3) sans métastases (29 janvier 1935, protocole histologique 2303), l'autre en cinquante jours avec des tumeurs multiples des cavités thoracique et abdominale, toutes du type fuso-cellulaire (protocole histologique 2.298, du 22 janvier 1935). Ni l'une ni l'autre de ces deux poules ne présentaient de signes anatomiques (rate et foie de volume normal) ou hématologique de leucémie.

Une *deuxième* série de passages réussissait avec les tumeurs de ces 2 poules : la poule A222, inoculée le 22 janvier 1935

avec la tumeur de A218, mourait en trente-quatre jours, le 25 novembre 1933 : énorme tumeur au point d'insertion intrapectorale du greffon. L'histologie (protocole 2.310) dénonçait encore un sarcome type Rous, une métastase débutante au niveau du foie et une légère érythroblastose de la moelle osseuse sans aucune image de leucose intravasculaire. Parallèlement, la poule A 226, inoculée avec la tumeur A 216 le 29 janvier 1935, mourait en vingt-quatre jours le 22 novembre 1935 avec une tumeur sarcomateuse volumineuse sans métastase, même histologique (protocole 2.315).

Une troisième lignée était obtenue sans difficulté aux dépens de la poule A 222. La poule A 235 recevait, le 4 mars 1935, un greffon tumoral dans le pectoral ; elle mourait, très amaigrie, le 12 avril 1935, avec une toute petite tumeur au point d'inoculation, du volume d'une noisette, mais, — comme le fait est fréquent —, avec de volumineuses et multiples tumeurs du foie et du poumon (photographie, fig. 4). L'histologie révélait encore leur nature purement sarcomateuse (protocole 2.363).

Cette souche ne s'est pas montrée virulente après filtration et après dessiccation.

En résumé : Inoculation intramusculaire de matériel leucémique, mort au bout de huit mois de sarcome fuso-cellulaire au point d'inoculation. Trois passages ultérieurs sans réapparition de leucose.

* *

Tels sont nos documents personnels.

Trois fois, comme on le voit, nous obtenons du sarcome fuso-cellulaire en inoculant de la leucémie. L'éventualité inverse, création de leucémie en inoculant du sarcome, n'est réalisée qu'une fois.

Avant d'envisager la valeur expérimentale de ces inoculations d'allure paradoxale, examinons brièvement les données actuelles de la littérature cancérologique.

Retenons tout d'abord que Sternberg a décrit chez l'homme des leuco-sarcomatoses avec associations de leucémie lymphoïde et de tumeur du type lymphosarcome ; de même il existe des leucémies myéloïdes compliquées de myélosarcomes.

Chez les gallinacés, Ellermann [2] avait décrit, sur 3 animaux atteints de leucémie « lymphoïde », des tumeurs constituées par des éléments lymphoïdes analogues à ceux du sang. Chez 2 poules atteintes de myélose aleucémique et de leucémie spontanées, Ellermann trouvait également des nodules myélomateux dans les organes ou sur le périoste. Mais ces tumeurs constituées par des éléments cellulaires identiques à ceux du sang, pouvaient être considérées comme reflétant seulement dans les tissus l'image hématologique.

Battaglia et Leinati [3] montrent ultérieurement que, dans les leucémies transmissibles, on peut observer des phénomènes prolifératifs du même type, mais constitués par des cellules moins évoluées du type hémocytoblastique. De même Engelbreth-Holm [4] signale, au point de l'inoculation du matériel leucémique, une accumulation d'érythroblastes créant une véritable petite tumeur.

Tous ces faits, comme ceux d'Ellermann, imposent la même déduction générale, à savoir que ces tumeurs ne sont que le reflet de l'image du sang.

Anderson et Bang [5] signalent par contre une tumeur de l'ovaire, fait assez banal chez les poules, à l'autopsie d'une leucose aviaire. A son tour, Furth [6] relate 3 cas de sarcomes polymorphes coïncidant avec la leucémie dans 3 cas spontanés.

La question pouvait donc se poser de savoir si le même virus était capable de donner de la leucémie et du sarcome typique. Furth concluait simplement à une coïncidence fortuite.

Avec les travaux de Ch. Oberling et M. Guérin [7, 8, 9], la question allait prendre une autre envergure. Ces auteurs, dans une série de mémoires échelonnés entre 1933 et 1934, étudient en détail les relations entre la leucémie érythroblastique et les processus néoplasiques. Ils insistent surtout sur les résultats obtenus par le séjour prolongé du matériel leucémique dans la glycérine et à la glacière, provoquant un changement dans le comportement de leur virus leucosique. Au lieu de rester à tropisme purement érythroblastique, le virus tendait à se fixer sur les éléments réticulo-endothéliaux. Oberling et Guérin annoncent même avoir obtenu au point d'inoculation de leur

souche leucémique ainsi traités, 11 cas de sarcomes vrais. C'est habituellement un sarcome fibroblastique assez dense, avec infiltration de leucocytes éosinophiles; parfois, on note l'aspect du fibro-sarcome ou l'aspect pseudo-myxomateux qui rappellent le sarcome de Rous.

Ces tumeurs sarcomateuses avaient une évolution variable, de quelques semaines à une année. Elles s'accompagnaient de métastases du même type cellulaire ou d'un type différent (endothéliome, réticulo-sarcome) et presque toujours de leucose sanguine.

Inoculées à une série de poulets, toutes ces tumeurs redonnèrent de la leucémie pure, comme si le virus retrouvait son activité sanguine exclusive et abandonnait son histiotropisme momentané (1).

Furth [10] étudie, sur 294 poulets, une souche de leucémie « lymphoïde ». Dix fois elle s'associe à des formations tumorales du type Murray-Begg (« endothéliome »). Plus récemment, il cite l'apparition d'un « ostéo-chondrosarcome » chez un poulet inoculé avec du virus leucémique; la greffe de cette tumeur provoque, selon les cas, une leucémie, une ostéo-chondrosarcome ou un mélange de deux lésions. Il voit également une série de tumeurs type endothélial se développer parallèlement à la leucose.

Rothe-Meyer et Engelbreth-Holm [11] observent, à l'autopsie d'un coq inoculé trois mois et demi auparavant avec du matériel leucémique, une leucémie du type myéloïde et des tumeurs sarcomateuses sur le tibia droit et les muscles de la cuisse. En faisant des passages, les auteurs obtenaient avec les sarcomes des sarcomes purs jusqu'au troisième passage. Inversement, l'inoculation du sang donne régulièrement de la leucémie, mais se complique de sarcome au troisième passage.

Rappelons, en terminant, que les mêmes problèmes ont été soulevés sur la souris et même sur le cobaye. Le tableau de la leucosarcomatose a été observé avec des souches de leucémie transmissible chez ces animaux.

(1) Avec une souche étrangère, Oberling et Guérin ne paraissent pas avoir retrouvé l'action de la glycérine et de la glace, comme avec leur souche française.



Peut-on, avec ces quelques documents expérimentaux, arriver à quelques conclusions précises sur les rapports étiologiques entre la leucose et la sarcomatose des gallinacés? Doit-on toujours différencier le virus leucosique du virus sarcomateux, ou doit-on admettre qu'un même virus provoque, tantôt la réaction sarcomateuse et tantôt la réaction leucosique de l'organisme?

La conclusion, *a priori*, paraît encore bien hasardeuse. L'étude systématique de la leucose mène à la conception qu'il existe sans doute des formes frustes de la maladie, peut-être même des formes latentes; d'autre part, la fréquence relative du processus néoplasique ne permet jamais de savoir si le poulet que l'on va inoculer n'est pas porteur latent du virus. Rappelons que la leucose peut ne s'extérioriser cliniquement que par une anémie grave. Nous avons vu avec M. Truche dans un grand poulailler, une épizootie de leucose caractérisée tantôt par des cas classiques, avec hypertrophie du foie et de la rate, tantôt seulement par une érythroblastose, tantôt seulement par un état cachectique. Si nous n'avons pu passer le « virus » de cette épizootie qu'en partant d'un cas classique de leucémie à une poule neuve, nous ne voudrions nullement conclure que les autres gallinacés malades, — même si l'image de leur sang n'était pas parfaitement typique — ne fussent pas eux aussi, atteints de la même maladie.

En matière de sarcomatose, des faits du même ordre ont été signalés. N'avons-nous pas insisté [4] sur les variations de virulence d'un de nos sarcomes transmissibles? Pas plus que la métastase n'est nécessaire pour formuler le diagnostic de cancer, la malignité fatale n'est pas un caractère absolu du processus néoplasique. Chez la poule, comme pour tant de maladies infectieuses, la maladie sarcomateuse expérimentale comporte des formes aiguës malignes, des formes chroniques, mortelles au bout de longs mois ou régressives, des formes abortives, suivies de guérison et d'immunité. On risque donc, dans ces conditions, d'inoculer un animal porteur latent du virus. La leucémie ou la tumeur que l'on chercherait à passer, pourrait simplement dévoiler une sarcomatose ou une leucémie latente,

qui se manifesterait dans la suite de l'expérience comme un virus de « sortie ».

Dans ces conditions, on doit demander à l'expérimentateur d'écarter certains faits suspects et de retenir seulement ceux qui demeurent suggestifs. En matière de tuberculose expérimentale, n'écarte-t-on pas volontiers, dans la crainte d'une tuberculose spontanée concomitante, les inoculations intraveineuses ou intrapéritonéales? Les inoculations sous-cutanées avec chancre d'inoculation et adénopathie régionale, sont incontestablement les plus démonstratives.

Or, que trouvons-nous dans l'étude documentaire qui précède?

Dans notre statistique personnelle, trois fois sur quatre, il s'agit d'inoculations intramusculaires, faites dans le pectoral et une fois seulement d'une inoculation intraveineuse, faite dans la veine axillaire.

Deux de nos trois inoculations intramusculaires provoquaient ultérieurement des tumeurs au voisinage (cas 1) ou au point exact du lieu d'inoculation (cas 4). Elles répondent donc pleinement au desideratum expérimental dont nous parlions à l'instant et permettent de juger que nous avons réellement transmis une maladie virulente d'une poule à une autre, et que nous avons créé un sarcome classique en partant d'une leucémie classique.

La troisième inoculation intramusculaire (cas 2) avait trait à l'éventualité inverse : création de leucémie par inoculation de sarcome. Il ne faut néanmoins pas s'étonner que nous n'ayons pas réalisé de tumeur leucosique d'inoculation; on sait, en effet, la rareté des tumeurs leucoïdes au cours des leucémies; avant d'obtenir une tumeur leucémoïde d'inoculation, il faudra répéter maintes et maintes fois l'inoculation de sarcomes variés!

Notre première expérience (1929) nous amenait, de plus, à conclure que l'inoculation de leucémie pouvait créer non seulement un ostéo-chondro-sarcome au voisinage immédiat du point d'inoculation, mais que le sang présentait encore l'image de la leuco-érythroblastose. Plus récemment, Furth a confirmé cette double donnée : avec un virus leucémique, il obtenait un ostéo-chondro-sarcome qui, à un deuxième passage, donnait soit un ostéo-chondro-sarcome, soit de nouveau de la leucémie.

Cette association de lésions tumorales sarcomateuses et de leucose sanguine, est-elle en faveur de l'unité ou de la dualité des virus? L'une et l'autre hypothèse peuvent être soutenues. Mais lorsque Oberling et Guérin obtiennent, en partant de leur souche de leucose, une série de sarcomes typiques au point d'inoculation et qu'au deuxième passage l'inoculation de ces sarcomes redonne de la leucémie sans sarcome, il est bien difficile d'admettre la dualité de virus? De même, quand Rothe-Meyer et Englbreth-Holm, en partant d'une leucémie, aboutissent à créer une souche de sarcome capable de redonner de la leucémie après trois passages, l'argument de la dualité de virus paraît impossible à soutenir.

Et que dire également de notre troisième expérience où le virus leucémique donne du sarcome pur à deux générations et à la troisième donne, sur 5 poules sarcomateuses, une leucémie associée des plus caractérisées?

D'après ces données, on en arrive à conclure que le virus leucosique est parfaitement capable de créer de toutes pièces une tumeur sarcomateuse. Inversement, le virus sarcomateux, nous l'avons remarqué dès 1932, est capable de déterminer une leucose mortelle. L'identité des virus ou tout au moins leur similitude, est des plus vraisemblables. Ajoutons, à ce propos, qu'ils possèdent dans la filtrabilité un caractère commun de la plus grande valeur.

La mutation du virus est-elle toujours aussi instable que dans notre première expérience, que dans celles d'Oberling et Guérin, de Rothe-Meyer et Engelbrecht-Hohn? Si nous en jugeons par notre dernière souche, nous devrions admettre que l'on peut obtenir une stabilité au moins temporaire.

Il s'agissait, rappelons-le, d'une inoculation d'un matériel leucémique (parenchyme hépatique) en plein muscle pectoral. Une tumeur se développait au point même de l'inoculation et l'animal mourait au bout de huit mois. La tumeur se révélait à l'analyse histologique, comme un sarcome type, avec zones myxoïdes, fibreuses, fuso-cellulaires, rappelant la tumeur de Rous sans aucune image de leucémie. Les mêmes caractères de pureté histologique dans la lignée sarcomateuse se retrouvaient aux trois passages ultérieurs. Il est difficile de préjuger si dans les passages actuellement en cours, nous ne reverrons

pas apparaître des stigmates leucémoïdes et si la mutation restera pure comme on peut l'admettre à l'heure actuelle.

Quoi qu'il en soit, il se dégage de toutes ces expériences, la notion que le virus de la leucose aviaire est apparenté avec celui de la sarcomatose. Si l'on ne peut affirmer sans réserves que ces deux virus n'en font qu'un, on peut dire qu'experimentalement ils paraissent interchangeables; leurs tropismes sanguin et tissulaire ne sont jamais parfaitement fixés et sont modifiables dans certaines conditions expérimentales, en particulier, en inoculant dans les muscles le matériel leucémique.

De toute manière, les faits expérimentaux actuels viennent singulièrement à l'appui de la vieille formule de Bard : « La leucémie est le cancer du sang ».

RÉSUMÉ.

1° Par inoculation dans le muscle d'une poule d'un sarcome fuso-cellulaire aviaire du mésentère, nous avons obtenu, au bout de deux mois, la mort de ce gallinacé en pleine leucémie;

2° Inversement, l'inoculation dans le pectoral de matériel leucémique, nous a montré avec 2 souches une tumeur au point d'inoculation (ostéo-chondro-sarcome, sarcome fuso-cellulaire avec zones myxoïdes);

3° De même, l'inoculation intraveineuse de sang leucémique a pu déterminer une sarcomatose généralisée;

4° Avec deux de nos souches, nous avons pu obtenir des passages. Avec l'une, au troisième passage, le virus qui avait donné deux sarcomes, retrouve sa faculté originelle de créer de la leucémie. Avec l'autre, le virus leucémique provoque des passages successifs de sarcome sans retour actuel de leucose;

5° L'apparition de leucémie chez une poule inoculée de sarcome, l'apparition d'un sarcome au point d'inoculation de matériel leucémique, l'identique filtrabilité des deux virus, l'apparition de leucose au cours de passages d'une souche sarcomateuse originellement leucémique, sont autant d'arguments en faveur de la thèse du virus unitaire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] JEAN TROISIER, Étude expérimentale de la sarcomatose spontanée des poules. *Bull. Ass. fr. étude du Cancer*, **23**, n° 3, mars 1934, p. 225-270, 13 figures.
- [2] ELLERMAN, The leucosis of Fowls and Leucemia problems. *Gyldendal*, London, 1921.
- [3] BATTAGLIA et LEINATI, Malattie sistemiche trasmissibile degli organi ematopoietici del pollo con ricerche sugli elementi morfologico del Sangue normale e loro genesi. *Boll. d. Inst. Sieroth. Milanese*, **8**, 1929, fasc. 1.
- [4] ENGELBRETH-HOLM, Untersuchung über die sogenannte Erythroleucose bei Hühnern. *Z. f. Imm.*, **75**, p. 425.
- [5] ANDERSON et BANG, Festschrift. *B. Bang*, 1928, 353.
- [6] FURTH, Observations with a new transmissible strain of the leucosis (leucemia) of fowls. *Journ. of exp. med.*, 1931, p. 243.
- [7] Ch. OBERLING et M. GUÉRIN, Lésions tumorales en rapport avec la leucémie transmissible des poules. *Bull. Ass. fr. Cancer*, mars 1933, p. 180-214.
- [8] Ch. OBERLING et M. GUÉRIN, Nouvelles recherches sur la production de tumeurs malignes avec le virus de la leucémie transmissible des poules. *Bull. Ass. fr. Cancer*, mai 1933, p. 326-359.
- [9] Ch. OBERLING et M. GUÉRIN, La leucémie érythroblastique ou érythroblastose transmissible des poules. *Bull. Ass. fr. Cancer*, **23**, n° 1, janvier 1934, p. 38-82.
- [10] FURTH, Lymphomatosis, myelomatosis and endothelioma of chickens caused by a filtrable agent. I Transmission experiments. *J. of Exp. Med.*, **58**, n° 3, 1^{er} septembre 1933, p. 253-275.
- [11] ROTHE-MEYER et ENGELBRETH-HOLM, Experimentelle Studien über die Beziehungen zwischen Hühnerleukose und Sarkom und der Hand eines Stammes von übertragbarer Leukose-Sarkom Kombination. *Acta path. Microb. Scand.*, **10**, 1933, p. 380-428.

RECHERCHES SUR LES VARIATIONS BIOLOGIQUES ET LA DISSOCIATION DU BACILLE TUBERCULEUX AVIAIRE

par A. SAENZ et L. COSTIL.

(*Institut Pasteur*
Laboratoire de recherches sur la tuberculose.)

Bien que des exemples de « variations » de l'espèce microbienne soient connus depuis le commencement de l'ère bactérienne, ces phénomènes n'ont attiré l'attention des bactériologistes et des pathologistes que par des études expérimentales apparues ces dernières années.

Les expériences sur l'atténuation ou l'exaltation de la virulence de plusieurs germes pathogènes, mises en évidence par les travaux de Pasteur (1880-1886), représentent les premiers exemples des variations de l'espèce microbienne en relation avec les agents extérieurs ou les milieux de culture où ces virus vivent et se multiplient.

A la même époque, Wasserzug (1888) décrit les variations morphologiques chez les bactéries sous l'influence des agents extérieurs et, par de nombreuses expériences, montre le rôle des milieux acides dans les changements de forme des colonies de plusieurs souches bactériennes.

Viennent ensuite les travaux de Lehmann et Neumann [1] en 1896 qui ont mis en lumière, par des études systématiques sur le pneumocoque, le bacille pyocyanique et les bacilles fluorescents, les relations qui existent entre la forme des colonies et leurs propriétés biologiques.

Ces études ont été complétées par les contributions expérimentales de Preisz [2] sur le bacille du charbon, de Neisser [3] (1906) et de Massini [4] (1907) sur le *B. coli*, donnant une orientation nouvelle aux recherches sur la variabilité bactérienne.

Weil et Félix (1917) dans leur travail sur le *Proteus* X 19

signalent deux types de colonies O et H possédant des antigènes agglutinants spécifiques. Les sérums des lapins, inoculés avec les colonies O, donnent un type d'agglutination fine qui se différencie nettement de l'agglutination grossière provoquée par le sérum anti-H.

Enfin c'est le grand mérite de Baerthlein [5] d'avoir confronté, de 1912 à 1918, une multitude d'observations, en apparence contradictoires, sur la variabilité. Après les avoir comparées aux résultats de ses propres expériences, Baerthlein arrive à la conclusion suivante : que l'instabilité des caractères morphologiques de chaque espèce microbienne est étroitement liée à des changements du pouvoir antigène, de la chromogénèse et de la virulence.

Ces travaux, demeurés classiques, ont jeté une nouvelle lumière sur ce sujet et ont permis, comme l'ont reconnu plus tard Arkwright et Hadley, d'interpréter les phénomènes de dissociation.

La variabilité des caractères des colonies fut confirmée par Arkwright et ses collaborateurs [6] (1920-1926) sur les bactéries du groupe coli-typhique-dysentérique. Ils identifièrent, dans chaque souche microbienne, deux types de colonies; le premier comprend des colonies à aspect lisse possédant la virulence; ils les désignèrent par la lettre S (smooth). Le second type comprend des colonies à aspect rugueux, à bords irréguliers, non virulentes; ce sont les colonies R (rough).

En France, Legroux et Magrou [7] (1920) étudiant l'état organisé des colonies bactériennes, en particulier celles du vibron cholérique, avaient signalé des aspects différents dans la structure des colonies (colonies lisses et colonies plissées).

Ensuite Bordet et Renaux, puis Wollmann ont désigné les différents aspects des colonies par les lettres B (bombé) et P (plat), mais c'est la nomenclature donnée par Arkwright qui a été suivie et est adoptée à l'heure actuelle par tous les microbiologistes.

En effet, les types de colonies d'Arkwright ont été retrouvés chez diverses espèces microbiennes par de nombreux auteurs, entre autres par Manninger [8] (1919) pour le bacille du choléra des poules, par de Kruif [9] (1921) pour la *pasteurella* du lapin (*B. leprosepticum*), par Cowan [10] (1922-1924) pour les

streptocoques, par Strycker (1917), par Griffith [41] (1923), Reimann et Amoss [42] pour les pneumocoques, par Topley et Ayrton [43] (1924), Goyle [44] (1926) pour le bacille *enteritidis*, par Hammerschmidt [45] (1924) pour le bacille diphtérique, par Balteanu [46] (1929) pour le vibrion cholérique, par Julianelle [47] (1926) pour le bacille de Friedlander, par Soule [48] (1928-1931) pour le *B. subtilis*, *B. megatherium* et *B. mesentericus*, par Schockaert [49] (1930) pour la bactériodie charbonneuse.

Enfin Hadley [38] en 1927, à qui on doit une excellente monographie sur cette question, proposa l'emploi du terme de « dissociation » pour caractériser les phénomènes de la variabilité microbienne, fait tangible et facilement décelable qui implique une modification plus ou moins profonde de la structure intime des éléments qui constituent la colonie.

La dissociation des bacilles acido-résistants en deux variétés R et S a été observée pour la première fois, en 1913, par Baerthlein et Tojoda [20] pour le bacille tuberculeux de la grenouille. Plus tard, en 1921, Gildemeister [21] en étudiant le bacille de la tortue, a fait des constatations analogues. Mais il n'est pas douteux que c'est aux travaux de Petroff et ses collaborateurs Branch et Steenken [22] sur la dissociation des bacilles tuberculeux aviaires, humains, bovins ou BCG qu'on doit les acquisitions les plus complètes sur ce sujet.

En ce qui concerne le bacille tuberculeux aviaire, Winn et Petroff [23] (1933) ont démontré les premiers que ces souches peuvent se dissocier en 4 variétés S (lisse), R (rugueux), Ch. (chromogène) et F. S. (plat-lisse) qui se distinguent entre elles non seulement par l'aspect de leurs colonies, leur pigmentation, leur teneur en lipides, mais aussi par leurs caractères physico-chimiques et surtout par leur virulence. Presque en même temps, ces faits se trouvaient confirmés en Amérique par Morton C. Kahn et Helen Schwarzkopf.

Dans nos recherches à ce sujet, contrairement à Winn et Petroff, nous avons reconnu que la variété F. S. admise par les auteurs américains, était due à un artifice de laboratoire, comme on peut s'en convaincre en effectuant des ensemencements punctiformes de la variété S pure, sur gélose glycélinée ou sur milieux à l'œuf, qui permettent de reproduire à volonté

la variété F. S. de Petroff. Ces colonies résultent en fait de l'agglomération après un long séjour à l'étuve ou à la température du laboratoire de plusieurs colonies de type S.

D'un autre côté, ces colonies F. S. [24] ont toujours fourni par réensemencements des cultures pures de la variété S. De même, inoculées aux animaux sensibles, elles ont montré une virulence identique et ont provoqué des lésions analogues à la variété S.

Birkhaug, à l'Institut Pasteur, dans ses recherches sur la dissociation du bacille tuberculeux, s'est rallié à notre manière de voir.

Pour ces raisons et d'autres observations d'ordre biologique, nous n'envisagerons dans ce travail que l'étude des colonies R, S et Ch. qui possèdent des propriétés morphologiques, antigènes et pathogènes spécifiques.

Pour obtenir la dissociation des souches aviaires, nous avons opéré *in vitro* ou *in vivo*. Dans le premier cas, nous avons repiqué séparément sur pomme de terre glycinée des colonies secondaires d'aspects différents obtenus par vieillissement de cultures laissées à l'étuve ou à la température du laboratoire. Ce procédé est excellent surtout lorsqu'il s'agit d'obtenir des colonies R en partant de cultures de type S. En effet, assez fréquemment, dans ces conditions, après des mois et quelquefois des années, nous avons vu apparaître, à la surface de cultures S originales ou ayant passé vingt à trente fois sur pomme de terre, des colonies secondaires du type R. Nous avons ainsi constaté avec une de nos souches aviaires « O. N. », l'apparition de plusieurs colonies R dans des tubes d'origine S restés quatre ans à la température du laboratoire. Parfois, le repiquage de ces colonies secondaires R fournit un mélange de colonies S et R; par dilutions et ensemencements successifs de ces dernières, on arrive assez facilement à les obtenir à l'état pur.

En ce qui concerne la dissociation *in vivo*, nous avons procédé comme suit :

10 milligrammes de bacilles aviaires, âgés de quinze jours, sont émulsionnés dans 10 cent. cubes d'eau physiologique et inoculés à des cobayes sous la peau du flanc; quinze jours plus tard, on ponctionne l'abcès local qui s'est formé. Le pus, traité par la méthode à l'acide sulfurique et neutralisa-

tion par la soude à 30 p. 100 que nous avons préconisée [25], est dilué dans vingt fois son volume d'eau physiologique stérile etensemencé sur 6 tubes de milieu à l'œuf-asparagine-vert malachite.

Si la culture inoculée avait l'aspect S typique du bacille aviaire, on constate, après un séjour de dix à quinze jours à l'étuve, que la plupart des tubes contiennent la variété S pure; pourtant certains présentent un mélange de colonies S, R et Ch. Le nombre des deux derniers types est toujours très restreint; il n'est jamais supérieur à 6 à 10 p. 100 (1).

Dans le cas contraire, quand on veut obtenir des colonies S en partant de cultures pures R, il est plus facile de s'adresser à la poule.

On inocule 10 milligrammes de corps bacillaires de type R, par voie intraveineuse et on sacrifie l'animal dix à quinze jours après l'inoculation. On procède ensuite à l'ensemencement d'un fragment de rate et de foie selon la technique indiquée précédemment. Nous sommes ainsi arrivés à obtenir des cultures ne contenant que d'abondantes colonies S.

Nous avons abouti à des résultats analogues par ensemencement des organes de lapins ou de poules infectés par le bacille aviaire ou en traitant le sang prélevé périodiquement par ponction cardiaque de ces animaux, par la méthode d'hémoculture de Loewenstein (2).

C'est en se servant de l'inoculation intraganglionnaire de Ninni et de l'hémoculture par la méthode de Loewenstein que Birkhaug, à l'Institut Pasteur, a réussi à dissocier *in vivo* chez le cobaye un certain nombre de souches de bacilles de Koch.

L'application des techniques précédentes et l'emploi des milieux de culture de Loewenstein ou de Petraghiani dans lequel nous avons remplacé la peptone par l'asparagine, nous ont permis de dissocier 5 souches de bacilles aviaires (O. N.,

(1) Assez fréquemment, surtout quand il s'agit de dissocier des souches aviaires au moment de leur isolement, il faut ensemencer 20 à 30 tubes avant d'obtenir des colonies R ou Ch.

(2) Nous tenons à faire remarquer, qu'en 1933, Ninni et Bretey, étudiant la différence de multiplication des différents types de bacilles tuberculeux dans le sang citraté de l'homme ou du lapin, avaient constaté que le sang est un bon agent de dissociation à la condition qu'il soit frais et que le nombre des colonies qui se développent dans chaque tube ensemencé avec 0 c.c. 1 du sang contaminé, ne soit pas supérieur à 10.

A. IV, E. L., A. A., L. 2), en variétés S, R et Ch. dont les caractères sont les suivants :

Colonies S (smooth, lisse). — A l'état isolé : colonies d'aspect lisse, humides, luisantes, rondes, hémisphériques, à bords réguliers et circulaires de 3 millimètres de diamètre environ, de couleur blanc-nacré, adhérentes au milieu de culture et à la spatule.

A l'état confluent : colonies qui se développent en nappe, plates, luisantes et humides, s'émulsionnent aisément, croissent en profondeur dans le bouillon glyciné ou le Sauton, en troublant uniformément les milieux, et forment à la surface un voile mince et lisse; elles poussent lentement dans les milieux ordinaires solides ou liquides non glycinés. Dans la gélose Veillon, elles ne se développent pas dans la zone d'anaérobiose de Legroux. Après un séjour de quatre à huit semaines d'étuve, elles alcalinisent le Sauton ajusté à $\text{pH} = 7,2$, mais ce phénomène n'est pas constant et nous avons des souches de type S qui ne modifient pas la réaction de ce milieu. Les souches de bacilles aviaires au moment de leur isolement sont constituées exclusivement par des colonies de type S. Les cultures pures de la variété S d'origine aviaire, entretenues sur pomme de terre glycinée, ont présenté une stabilité remarquable. Nous avons conservé, pendant plus de trois années, 2 souches (E. L. et O. N.) de la variété S qui ont subi respectivement vingt-six et trente-huit passages *in vitro* sur pomme de terre glycinée sans que leurs caractères morphologiques se soient aucunement modifiés. La variété S pousse assez abondamment dans le milieu bilié de Calmette et Guérin; elle présente une stabilité plus marquée sur pomme de terre biliée que sur pomme de terre glycinée. Nous avons réussi à l'entretenir sur ce premier milieu pendant quarante-six passages et transplantée à cette époque sur pomme de terre glycinée, elle a conservé ses caractères morphologiques.

Nous avons également reconnu [26] que cette variante S du bacille aviaire, une fois adaptée et réensemencée sur les milieux électifs à l'œuf-asparagine, se développe lentement à l'obscurité entre 25 et 32°.

Les colonies de la variété S sont formées par de courts bâtonnets acido-résistants, Gram positifs, droits ou légèrement

incurvés avec de nombreuses formes non acido-résistantes. Après coloration par la méthode de Ziehl-Neelsen, ces bacilles se montrent toujours plus courts et moins acido-résistants que les bacilles de la variété R.



(Cliché Jeantet).

FIG. 1. — Caractères de la variété R de la souche aviaire O. N. sur les différents milieux de culture.

- 1, Variété R sur pomme de terre glycinée; 2, Variété R sur gélose glycinée; 3, 4 et 5, Divers aspects de la variété R, sur milieu à l'œuf de Loewenstein.

Colonies (Ch. chromogènes). — Colonies de caractères identiques à ceux de la variété S, sauf qu'elles sont pigmentées, de



(Cliché Jeantet).

FIG. 2. — Caractères des variétés S et Ch. de la souche aviaire O. N. sur les différents milieux de culture.

1, Variété S sur pomme de terre glycinée; 2, Variété S sur gélose Sabouraud; 3, 4, 5 et 6, Quatre aspects différents de la variété Ch., intensément pigmentée en jaune sur milieu à l'œuf de Loewenstein.

couleur orre d'intensité variable suivant la souche aviaire isolée.

Nous avons démontré [27] que la variété Ch. a deux origines différentes.

En premier lieu, elle peut être obtenue d'emblée, ainsi que nous l'avons observé maintes fois (A. L., O. N.) à partir d'ensemencements d'organes (cerveau, rate) d'animaux inoculés avec des bacilles aviaires. Parmi 200 colonies blanc-nacré du type S, on n'observa jamais plus d'une ou deux colonies nettement chromogènes. Un autre procédé plus facile d'obtention de cette variété consiste à laisser séjourner à la lumière et à la température du laboratoire des tubes de cultures ensemencés avec le type S pur non chromogène (A. L., L. 2 et A. IV). L'expérience suivante démontre, en effet, que cette chromogénèse ne s'effectue pas à l'obscurité.

On prépare deux séries de tubes ensemencés avec la variété S de plusieurs souches de bacilles aviaires. Une première série est exposée à la lumière tandis que les autres tubes sont gardés dans une boîte hermétiquement close, placée dans une chambre noire. La lecture des résultats, après un mois, montre que les cultures laissées à la lumière se sont uniformément pigmentées à des degrés différents suivant l'origine des variétés S employées. Par contre, dans les tubes mis à l'abri de la lumière, aucune pigmentation n'est apparue après un délai de six mois d'observation.

Nous sommes parvenus, quoique très difficilement, à adapter et à stabiliser cette variété Ch. (souche L. 2) qui a conservé ses caractères malgré seize passages consécutifs, à vingt jours d'intervalle, sur pomme de terre glycinée. Nous avons seulement constaté que l'intensité de la pigmentation diminue avec le nombre des réensemencements *in vitro*.

Colonies R (rough, rugueuse). — Les cultures pures de la variété R du bacille aviaire présentent des caractères identiques à ceux des souches de bacilles des mammifères « eugoniques ». Ces colonies ont une surface rugueuse, sèche, plissée, à bords irréguliers et contournés, n'adhèrent pas aux milieux solides et croissent plus rapidement que la variété S correspondante. De couleur légèrement jaunâtre, ces colonies ne se développent pas entre 25 et 32°, ni dans les milieux ordinaires liquides ou solides non glycinés. La variété R pousse très lentement sur pomme de terre biliée. Elle s'émulsionne très difficilement et ne trouble pas les milieux liquides comme le bouillon glyciné ou le Sauton dans lesquels elle se développe en aérobiose stricte,

formant un voile épais, ridé, qui atteint son complet développement après un séjour de vingt-cinq à trente jours à l'étuve et remonte sur les parois des ballons comme le font les cultures de bacilles des mammifères. Après cinq à six semaines d'étuve, les colonies R diffusent dans le milieu de Sauton un pigment légèrement jaunâtre. Elles acidifient le même milieu ajusté à $\text{pH} = 7,2$ jusqu'à 5,6 après huit semaines d'étuve.

Dans des études sur la toxicité comparée des solutions d'acide sulfurique et d'acide acétique, nous avons montré [28] que l'acide sulfurique est pratiquement inoffensif pour les variétés R et S du bacille aviaire en opposition avec l'acide acétique qui, à des concentrations supérieures à 5 p. 100, exerce une action empêchante totale sur le développement des variétés précitées.

Les photographies précédentes, que nous devons à l'obligeance de M. Jeantet, montrent les variétés S, R et Ch. de la souche aviaire O. N. et permettent de se rendre compte des caractères que nous avons décrits précédemment.

PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES POUR LA POULE ET POUR LE LAPIN DES VARIÉTÉS R ET S DE LA SOUCHE O. N.

ÉTUDE DE LEUR VIRULENCE PENDANT QUATRE ANNÉES CONSÉCUTIVES.

Le 25 avril 1931, l'ensemencement d'un fragment de rate d'une poule inoculée avec la souche aviaire O. N. a donné lieu après quinze jours à une culture spontanément dissociée en variétés R et S. Ces différents types de colonies, transplantés séparément sur pomme de terre, ont fourni des cultures pures R et S.

Le 23 juin 1931, on inocule ces variétés à deux poules, par voie veineuse, à la dose de 1 milligramme. La poule qui avait reçu la variété S est morte le dix-huitième jour, atteinte d'une tuberculose de forme aiguë, toxique, septicémique, caractérisée par une cachexie prononcée, une énorme hypertrophie du foie et de la rate qui ne présentaient pas de lésions visibles à l'œil nu. Les frottis de tous ces organes contenaient des bacilles acido-résistants en abondance.

La poule inoculée avec la variété R, sacrifiée à la même date, présentait de nombreuses lésions nodulaires dans la rate et le

foie qui montraient, comme l'animal précédent, de nombreux bacilles sur les frottis.

Lesensemencements effectués à partir de ces deux poules inoculées l'une avec la variété R, l'autre avec la S, ont tous donné des cultures de type S.

De 2 lapins, qui avaient reçu par voie veineuse 10 milligrammes des variétés S et R, le premier meurt le vingtième jour et l'autopsie permet de constater une énorme hypertrophie du foie et de la rate et des lésions inflammatoires œdémateuses banales sur les poumons. L'autre animal, inoculé avec la variété R, fut sacrifié le même jour; il présentait une hypertrophie peu marquée des organes abdominaux qui montraient d'abondants bacilles acido-résistants.

Comme précédemment, l'ensemencement des organes a fourni, dans les 2 cas, des cultures pures de type S.

PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DES VARIÉTÉS R ET S DE LA SOUCHE O. N., DIX-SEPT MOIS APRÈS LEUR ISOLEMENT. — Le 7 octobre 1932, on inocule 6 poules avec les variantes R et S de la souche O. N. qui avaient subi seize passages sur pomme de terre glycérinée, sans que leurs caractères morphologiques se soient modifiés.

Les 3 poules, qui avaient reçu respectivement 1/10, 1/100 et 1/1.000 de milligramme, sont mortes entre vingt-cinq et quarante-deux jours, de tuberculose aiguë, septicémique, type toxique. Les frottis et lesensemencements ont donné les mêmes résultats que ceux de la poule inoculée avec cette variété S au moment de l'isolement.

Des 3 poules qui avaient reçu la variété R, dont 2 à raison de 10 milligrammes et la dernière avec 1/10 de milligramme, l'une (10 milligrammes) est sacrifiée après deux mois. A l'autopsie, on constate une légère hypertrophie de la rate et du foie avec quelques granulations sur ce dernier organe. Un fragment de foie broyé est inoculé par voie sous-cutanée à une poule qui meurt le sixième mois avec des lésions chroniques discrètes nodulaires du foie, caractéristiques de la forme habituelle de la tuberculose naturelle des oiseaux et de celle provoquée par la variété R.

La deuxième poule, qui avait reçu 10 milligrammes, est morte huit mois et demi après l'inoculation, en bon état

général apparent, mais à l'autopsie, elle montrait une légère hypertrophie du foie et de la rate avec, sur ce dernier organe, quelques tubercules blanc-nacré de la grosseur d'une lentille.

Un lapin, laissé au contact de cette poule, fut sacrifié après huit mois en parfait état de santé et trouvé indemne de toute lésion suspecte. Mais l'ensemencement de sa rate a fourni, au bout de vingt-et un jours, trois colonies de type R qui, dans la suite, se sont révélées comme appartenant à la souche O. N. La portée de cette constatation est considérable. En effet, elle nous montre que la variante R, quoique non virulente pour le lapin, peut être hébergée par cet animal, sans qu'il accuse aucun trouble, pendant de longs mois. Ces observations confirment celles que A. Boquet a faites avec nous [29] au sujet du parasitisme du bacille tuberculeux aviaire dans l'organisme du cobaye.

La troisième poule, qui avait reçu 1/10 de milligramme, a été sacrifiée six mois après l'inoculation et ses organes furent trouvés intacts.

Le 29 septembre 1932, 2 lapins reçoivent, par voie intraveineuse, 1/10 et 1 milligramme de la variété S; ils sont morts cachectiques respectivement au bout de vingt-cinq et dix-neuf jours, avec des lésions de tuberculose aiguë, septicémique, type Yersin analogues à celles des lapins inoculés seize mois auparavant.

2 autres lapins, inoculés à la même époque et dans les mêmes conditions mais avec la variété R de la souche O. N., ont été sacrifiés le huitième mois et ont été trouvés indemnes de toute lésion viscérale suspecte; toutefois, celui qui avait reçu 1/10 de milligramme présentait des lésions d'ostéo-arthrite des articulations postérieures.

PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DES VARIÉTÉS R ET S DE LA SOUCHE O. N. VINGT-HUIT MOIS APRÈS LEUR ISOLEMENT. — On emploie pour cette expérience, effectuée le 3 octobre 1933, des cultures R et S âgées de vingt jours, ayant subi trente passages successifs sur pomme de terre glycinée et dont les caractères morphologiques n'avaient souffert aucune modification.

2 lapins et 4 poules sont inoculés avec la variété S, par voie intraveineuse, les premiers à la dose de 1 milligramme et les

dernières avec 1/100 de milligramme. L'un des lapins est mort dans les délais normaux, l'autre fut sacrifié en très mauvais état le trente-quatrième jour; tous deux présentaient les lésions tuberculeuses habituellement provoquées par cette variété.

Les 4 poules sont mortes entre trente et quarante jours.

2 lapins et 2 poules inoculés, dans les mêmes conditions, avec 1 et 10 milligrammes de la variété R n'ont accusé aucun trouble et, sacrifiés en bon état entre trente-cinq jours et quinze mois, ont montré des organes normaux.

Cette expérience met en relief la stabilité de la virulence de la variété S qui, malgré deux années de repiquage *in vitro* tue les animaux réceptifs dans le même laps de temps qu'au moment de l'isolement.

DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL ENTRE LES LÉSIONS PROVOQUÉES
CHEZ LE LAPIN PAR LA VARIÉTÉ S D'ORIGINE AVIAIRE
ET LE BACILLE BOVIN.

Nous avons vu précédemment que l'inoculation de doses massives, 1 à 10 milligrammes par voie intraveineuse de la variété S chez le lapin provoque une tuberculose aiguë d'allure septicémique, rapidement mortelle (quatorze à dix-huit jours), caractérisée par des manifestations toxiques, cachexie, congestion intense et hypertrophie du foie et de la rate, œdème généralisé des poumons, sans qu'aucun de ces organes présentent de lésions tuberculeuses nodulaires macroscopiques.

Mais quand la variété S est inoculée à faibles doses, chez le lapin, les lésions sont tout à fait différentes et ressemblent d'une façon frappante à celles déterminées par le bacille bovin, comme le prouve l'expérience suivante :

Le 30 mai 1933, nous effectuons le dosage de la virulence de la variété S de la souche O. N. pour le lapin [30]. A cet effet, on fait une émulsion en eau physiologique de bacilles provenant d'une culture sur pomme de terre glycinée, âgée de vingt jours et ayant subi vingt-quatre passages sur ce même milieu. 4 lapins qui avaient reçu 1/1.000 de milligramme par voie intraveineuse, meurent respectivement trente, quarante et quatre-vingt-dix (deux) jours après l'inoculation. Chez ces animaux, nous avons trouvé à l'autopsie des lésions très différentes de celles que nous avons constatées chez les lapins inoculés avec des doses massives. On est frappé tout d'abord

par l'hypertrophie et la congestion beaucoup plus discrètes des organes abdominaux. Par contre, les reins, la rate et le foie présentent des lésions nodulaires qui manquent presque toujours avec les fortes doses. De même, les poumons, surtout à la base, sont parsemés de petits nodules blanc-nacré, ronds, confluent ou disséminés dont l'abondance varie suivant les animaux. Les frottis de tous ces organes montrent de nombreux bacilles acido-résistants.

Les mêmes lésions ont été observées chaque fois que nous avons inoculé 1/100 à 1/1.000 de milligramme de nos quatre autres souches étudiées (A. A., EL. L. 2 et A. IV).

Quand il s'agit d'inoculations de doses massives de bacilles bovins ou de la variété S d'origine aviaire, le diagnostic différentiel est très aisé. En effet, dans nos recherches, 1, 5 et 10 milligrammes de plusieurs souches d'origine bovine déterminaient la mort de l'animal dans les mêmes délais que la variété S aviaire mais produisaient toujours dans les poumons (1) des lésions de tuberculose nodulaire généralisée macroscopiques qu'on n'observe presque jamais avec des doses massives de la variété S.

Le diagnostic devient difficile et quelquefois impossible à établir avec de faibles doses. Cependant, le bacille bovin provoque, en général, une tuberculose plus régulière de tous les organes et des lésions pulmonaires caséeuses plus prononcées que la variété S. Par contre, les frottis des organes montrent, dans le premier cas, des bacilles en moindre abondance.

Ces différences ne sont, en réalité, qu'une question de nuances et, certaines fois, nous avons dû recourir à la poule ou au cobaye, pour arriver à un diagnostic certain.

PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DES VARIÉTÉS R ET S DE LA SOUCHE O. N. QUATRE ANS APRÈS LEUR ISOLEMENT. — L'étude de la variété S de la souche O. N., éprouvée chez la poule et le lapin dans la période qui va du 11 janvier au 15 mai 1934, c'est-à-dire du trente-huitième au quarante-troisième passage sur pomme de terre glycinée, nous a démontré que sa virulence s'était maintenue constante.

En effet, deux poules inoculées avec 1/10 et 1 milligramme

(1) Nos constatations confirment les recherches toutes récentes de van Deinse et Domanski (39) qui, dans leur étude sur la septicémie tuberculeuse chez le lapin provoquée par des inoculations massives de la variété S aviaire ou de bacilles bovins, arrivent à des résultats identiques.

et un lapin qui avait reçu 1/1.000 de milligramme de cette souche sont morts respectivement après trente-huit, trente-quatre et quarante-huit jours en présentant les lésions habituellement produites par la variété S.

Par contre, l'inoculation de la variété R, aux quarantième et quarante-troisième passages, à 4 poules par voie intraveineuse ou sous-cutanée, à la dose de 10 milligrammes, et à 2 lapins par voie intraveineuse à la dose de 5 milligrammes n'a provoqué aucun trouble chez ces animaux sacrifiés entre quarante jours et treize mois.

Ces expériences montrent que la virulence de la variété S s'est conservée intacte pendant quatre années. Au contraire, la variété R, qui lors de son isolement tuberculisait la poule en six à huit mois à la dose de 10 milligrammes avec des lésions nodulaires chroniques identiques à celles observées dans la tuberculose naturelle des oiseaux, ne provoque maintenant, après quarante-trois passages sur pomme de terre glycinée, aucun trouble chez cet animal, après un délai d'observation de plus d'une année.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES ET VIRULENCE DE LA VARIÉTÉ S
DE LA SOUCHE O. N. CONSERVÉE PENDANT PLUS DE TROIS ANS
À LA TEMPÉRATURE DU LABORATOIRE.

Le 20 juillet 1934, on procède au repiquage sur milieu de Lœwenstein de la variété S¹ (1) de la souche O. N., dont la culture était du 11 juillet 1931. Au bout d'un mois, cette nouvelle culture S² avait abondamment poussé avec l'aspect caractéristique et on s'en sert pour inoculer, par voie intraveineuse, 2 poules à la dose de 1/10 et 1 milligramme et 2 lapins avec 1/100 et 1/10 de milligramme. Ces quatre animaux sont morts respectivement après vingt-sept, dix-huit, vingt cinq et vingt jours présentant des lésions tuberculeuses du type classique dû à l'inoculation de cette variété S.

Après dix passages consécutifs, cette souche S² conserve sa virulence initiale pour la poule et le lapin.

(1) Nous désignons par S¹ la culture originale et par S² et S³, es souches qui en sont issues dans certaines conditions.

Le 2 novembre 1934, on procède au repiquage d'un autre tube contenant une culture pure de la variété S, obtenue à partir d'une poule inoculée avec la souche S¹ originale et morte le 11 juillet 1931. On constate au bout d'un mois de belles cultures de type S sur pomme de terre glycinée et sur les milieux à l'œuf ensemencés. Le 7 décembre 1934, on utilise cette souche S³ pour l'inoculation intraveineuse de 2 poules à la dose de 1/10 et 1 milligramme et de 2 lapins avec 1 milligramme. Les poules sont mortes le trente-troisième et le vingt-troisième jour et les lapins le vingt-septième et le vingt et unième jour après l'inoculation avec la forme aiguë typique de tuberculose provoquée par la variété S.

En résumé, par des repiquages successifs pratiqués pendant trois ans, trois ans et quatre mois avec des variétés S, on a réussi à obtenir 2 souches (S² et S³) dont les caractères morphologiques et de virulence pour la poule et le lapin ont été identiques à ceux de la souche originale (S¹).

ESSAIS DE VACCINATION CHEZ LE LAPIN PAR LA VARIÉTÉ R DU BACILLE AVIAIRE CONTRE LA VARIÉTÉ S HOMOLOGUE.

Un lot de 5 lapins reçoit, par voie veineuse, 1 milligramme de la variété R de la souche O. N. ayant subi vingt-six passages sur pomme de terre glycinée.

Six semaines après, ces animaux sont éprouvés, ainsi que 4 témoins, par la même voie, avec 1/1.000 de milligramme de la variété S correspondante.

Les animaux témoins sont morts entre trente et un et quarante-sept jours présentant à l'autopsie un foie, une rate et des poumons congestionnés et hypertrophiés avec des lésions du type Yersin.

Parmi les 5 lapins vaccinés, un est mort de pasteurellose le quatre-vingt-dixième jour. L'examen des organes ne permit pas de déceler des bacilles acido-résistants. Un second meurt également de maladie intercurrente, pneumococcie, après cent quinze jours, montrant pour toute lésion de rares granulations à la base des deux poumons contenant des bacilles acido-résistants.

Les 3 autres lapins vaccinés, en bon état de santé, sont

sacrifiés respectivement sept, dix et treize mois après l'inoculation; ils présentaient des organes normaux, mais l'un d'entre eux (sacrifié le dixième mois) était atteint d'ostéo-arthrites fémoro-tibiales et tibio-tarsiennes dont le pus contenait des bacilles acido-résistants.

Ces expériences montrent qu'on parvient très facilement, en utilisant la variété R du bacille aviaire, à vacciner le lapin contre la variété S de même origine, virulente dans les conditions habituelles pour cet animal [31].

Une deuxième expérience pratiquée comme précédemment a donné des résultats superposables.

D'un autre côté, nous avons utilisé la variété S de la souche O. N. pour préparer des cobayes qui ont été éprouvés après quelques semaines avec des souches de bacilles tuberculeux des mammifères. Ces essais ont permis de constater que la variété S d'origine aviaire confère au cobaye un degré de résistance fort appréciable vis-à-vis des bacilles virulents.

PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES, POUR LA SOURIS, DES VARIÉTÉS R ET S DU BACILLE AVIAIRE.

Poursuivant nos recherches, nous avons étudié [32] les différences de virulence des variétés R et S observées chez la souris inoculée par voie péritonéale ou sous-cutanée.

Dans ce but, nous avons pratiqué deux séries d'expériences.

Dans la première, trois lots de souris reçoivent 1/10, 1 et 10 milligrammes des variétés R et S par voie péritonéale.

La deuxième série comprend les mêmes inoculations mais par voie sous-cutanée.

L'ensemble de ces expériences nous montre que les variétés dissociées des souches aviaires se comportent différemment suivant la voie d'inoculation. En effet, tandis que l'inoculation de la variété S provoque chez la souris, par voie péritonéale, l'hypertrophie du foie et de la rate, caractéristique du type Yersin, elle produit, par voie sous-cutanée, une tuberculose généralisée évolutive du type Villemin. L'inoculation péritonéale de la variété S détermine donc chez la souris le même type de tuberculose que l'inoculation intraveineuse chez le lapin.

D'autre part, la virulence des deux variétés R et S se révèle nettement différente; de même que pour le lapin, la variété S se montre très pathogène pour la souris tandis que la variété R, dans les mêmes conditions, est tout à fait inoffensive pour cet animal.

PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES

DE LA VARIÉTÉ CH. DE LA SOUCHE AVIAIRE O. N.

Les animaux réceptifs inoculés avec la variété Ch. du bacille aviaire se comportent comme ceux inoculés avec la variété R de même origine ainsi que le prouve l'expérience suivante.

2 poules reçoivent, par voie veineuse, 0 milligr. 1 de la variété Ch. de la souche O. N., provenant d'une culture sur milieu de Lœwenstein âgée de trente jours. Observées pendant six mois, elles se maintinrent en excellente santé. Elles moururent respectivement le neuvième et le seizième mois, montrant à l'autopsie un foie et une rate légèrement hypertrophiés avec quelques tubercules blanc-nacré de la grosseur d'une lentille et des lésions chroniques de l'intestin : tableau classique de l'infection par la variété R.

L'examen anatomo-pathologique et les frottis des organes confirmèrent le diagnostic de tuberculose chronique telle qu'elle résulte, dans certaines conditions, de l'inoculation de la variété R du bacille aviaire.

Une culture de la variété Ch., qui avait subi six passages sur pomme de terre glycinée,ensemencée dans le milieu liquide de Sauton à un $\text{pH} = 7,2$ l'a acidifié à 6.4 après un séjour de quatre semaines à l'étuve; après soixante jours, on put constater que cette acidité s'était maintenue. En même temps, on observa que la culture se développait en voile et laissait diffuser un pigment jaune dans le liquide, c'est-à-dire qu'elle se comportait exactement comme la variété R de même origine. L'ensemencement de ce voile sur pomme de terre glycinée fournit une culture de type R.

Les inoculations aux animaux sensibles ont démontré qu'il y avait eu réversibilité de cette variété Ch. en R.

POUVOIR PATHOGÈNE DES VARIÉTÉS R, S ET CH.
DE LA SOUCHE E. L. POUR LA POULE.

Nous avons préparé des émulsions contenant 1/10 ou 1 milligramme par centimètre cube de cultures pures des variétés R, S et Ch. de la souche E. L. sur pomme de terre glycinée, âgées de dix-huit jours.

De **trois** poules inoculées, par voie veineuse, avec respectivement 1 milligramme de chacune de ces souches, seul l'animal qui avait reçu la variété S est mort spontanément le vingt-cinquième jour, cachectique avec une énorme hypertrophie du foie et de la rate (sans lésions macroscopiques), identique à celle provoquée par la variété S de la souche aviaire O. N.

Les 2 autres poules, sacrifiées le même jour, en très bon état, furent trouvées indemnes de lésions suspectes.

De même, une dose de 1/10 de milligramme des variétés R, S et Ch. inoculée respectivement à 3 poules, par voie veineuse, tue en quarante jours celle qui avait reçu la variété S; à l'autopsie, on constate une énorme hypertrophie du foie (160 grammes) et de la rate (13 grammes) qui sont parsemés de petites granulations blanc-perlé à la limite de la visibilité, une congestion intense de la moelle osseuse et des reins; les frottis des organes fourmillent de bacilles acido-résistants. L'examen histologique pratiqué par M. Bablet a montré un foie et une rate congestionnés, bourrés de follicules épithélioïdes souvent caséux et riches en bacilles acido-résistants.

Les deux autres poules, sacrifiées le même jour, en très bon état de santé, ont montré à l'autopsie des organes normaux; les organes de la poule inoculée avec la variété R, ne contenaient pas de bacilles à l'examen direct tandis que l'animal qui avait reçu la variété Ch. présentait sur les frottis quelques bacilles acido-résistants.

Les examens histologiques (M. Bablet) des organes de ces animaux ont donné :

Pour la poule inoculée avec la variété R.

Foie : Quelques nodules histio-lymphocytaires non caséux pauvres en bacilles acido-résistants.

Rate : Nombreux nodules épithélioïdes à cellules géantes centrales, souvent caséux et riches en bacilles acido-résistants.

Et pour la poule ayant reçu la variété Ch.

Foie et Rate : Bourrés de nodules épithélioïdes non caséeux contenant de rares bacilles acido-résistants disséminés.

Voici l'étude comparative, que nous devons à l'obligeance de M. Bablet, des lésions histologiques provoquées par les variétés R, S et Ch. de la souche E. L. dans le cas précédent.

1° *La variété S est la plus agressive.* — Les lobules hépatiques sont dissociés par de très nombreux follicules à limites peu précises, à centre souvent caséeux. La structure de la rate est complètement bouleversée par le nombre et la densité de ces mêmes follicules épithélioïdes, souvent confluent, presque toujours caséeux. Les bacilles acido-résistants, souvent disposés en paquets, sont extrêmement nombreux.

2° *La variété R* n'a vis-à-vis des organes examinés qu'une faible agressivité. L'intégrité du lobule et des cellules hépatiques est respectée; de même, la structure générale de la rate. Les lésions spécifiques sont représentées par de petits nodules histiocytaires syncytiaux, à limites nettes, à bacilles rares et disséminés. Dans la rate seulement, quelques-uns de ces nodules (1 sur 5 environ) montrent une nécrose centrale et des bacilles acido-résistants assez nombreux. Les autres non caséux sont parfois centrés par une cellule géante.

3° *La variété Ch.* manifeste des propriétés intermédiaires entre R et S au point de vue de l'agressivité. Le foie et la rate sont très riches en nodules réactionnels, mais ceux-ci sont bien limités, non caséux, formés de placards épithélioïdes encadrés de lymphocytes; les bacilles y sont rares et disséminés. L'intégrité anatomique des organes est respectée.

Les lésions anatomiques et les caractères de virulence des variétés R, S et Ch. décrits précédemment pour la poule sont ceux qu'on obtient avec chaque variété au moment de son isolement. Nous avons démontré que cette virulence, pour la variété R, peut s'atténuer au fur et à mesure des réensemencements *in vitro* (souche O. N.).

Nous avons fait des constatations analogues avec la variété R des souches E. L. et L. 2.

En réalité, ces faits nous montrent qu'il n'existe, dans chaque souche de bacille aviaire, que deux types de colonies nettement différenciés : la variété R qui produit des lésions nodulaires

représenterait la forme habituelle de la tuberculose naturelle des oiseaux ; en opposition, le type S détermine des lésions tuberculeuses exsudatives, hémorragiques, aiguës, septicémiques, d'allure toxique, caractérisées en général par une hypertrophie importante du foie et de la rate qui ne présentent pas de nodules visibles à l'œil nu.

L'étude des propriétés pathogènes, pour la poule et pour le lapin, des variétés R et S de deux autres souches aviaires, L.2 et A.IV, nous a permis de faire des constatations analogues aux précédentes. La variété S a déterminé chez ces animaux des lésions de tuberculose exsudative, aiguë, septicémique, d'allure toxique tandis que la variété R, dans les mêmes conditions, s'est montrée inoffensive.

Nous avons constaté une exception avec la souche A.A. Ici la variété R, bien que sensiblement moins virulente que la variété S homologue, s'est montrée, au moment de l'isolement et après douze à seize passages sur pomme de terre, virulente pour la poule même à la dose de 1/10 de milligramme qui tue cet animal entre quarante-cinq à soixante jours, avec des lésions nodulaires de tuberculose à allure toxique.

Cette culture d'aspect R offrait pourtant, à la spatule, au moment du repiquage, une consistance particulière semblable à celle des colonies S. D'un autre côté, les ensemencements d'organes pratiqués à quatre reprises, chez des animaux inoculés avec cette souche R, ont toujours fourni exclusivement des colonies du type S. Ces deux faits nous ont donné lieu de penser que cette culture soi-disant R ne devait pas être encore complètement débarrassée des colonies S et qu'il s'agissait de cultures impures, constituées par un mélange de R et de S, incomplètement dissociées. Des recherches en cours nous fixeront ultérieurement sur cette question, car pour le moment, elles ne nous permettent de tirer aucune conclusion.

EXPLICATION DES FLUCTUATIONS DE VIRULENCE

DES CULTURES DE BACILLES AVIAIRES

RÉVÉLÉE PAR L'ÉTUDE DES COLONIES DISSOCIÉES R ET S.

On sait que les cultures de bacilles tuberculeux aviaires, représentées exclusivement par le type S, au moment de l'iso-

lement, subissent fréquemment des changements de virulence que les microbiologistes qui se sont occupés de cette étude ne sont jamais parvenus à expliquer.

Ces cultures qui, lors de leur isolement, se montrent virulentes, pour la poule et pour le lapin, se trouvent quelquefois complètement privées de virulence lorsqu'on les cultive pendant longtemps sur pomme de terre glycinée. Dans ces conditions, on n'arrive pas à tuberculiser les animaux réceptifs au bacille aviaire avec ces cultures, même en leur inoculant des doses 100 ou 1.000 fois plus fortes qu'au moment de l'isolement.

En même temps que se produisent ces changements de virulence, on observe des modifications dans l'aspect des cultures. Celles-ci perdent leur caractère lisse, gras, typique des souches aviaires. Elles deviennent premièrement plissées, quelquefois chromogènes, puis se transforment, au fur et à mesure des passages sur pomme de terre, en colonies sèches rugueuses, du type R, dont l'aspect est semblable aux cultures des bacilles des mammifères.

Nous avons particulièrement étudié une souche d'origine aviaire, A. IV [33], entretenue depuis plusieurs années sur pomme de terre glycinée ; sa virulence pour la poule avait disparu en même temps qu'elle prenait l'aspect R. Nous l'avons dissociée *in vivo* suivant les techniques indiquées précédemment et nous avons retrouvé, avec la variété S dissociée, la virulence initiale perdue.

Nos recherches sur la dissociation de la souche O. N. ainsi que cette dernière expérience nous ont permis d'expliquer les causes des fluctuations des souches aviaires et la manière de les éviter. En effet, l'atténuation ou la disparition de la virulence, qu'on observe dans les cultures aviaires entretenues sur pomme de terre glycinée, est due à ce que ce milieu ne convient pas à la conservation des caractères normaux du bacille aviaire [34]. La variété S, qui est exclusive dans les cultures fraîchement isolées et virulentes, est remplacée par la variété R, non pathogène pour les animaux sensibles. En d'autres termes, il se produit une réversibilité de S en R. On conçoit facilement que, si on inocule une souche au moment où cette réversion de S en R n'est pas complète (mélange de

R et de S), le résultat soit simplement une atténuation de virulence. Autrement dit, d'après nos observations, cette réversion ne s'opère pas brusquement et tous les degrés de virulence constatée peuvent ainsi s'expliquer.

Nous avons observé, par contre, que le milieu à l'œuf-asparagine-vert malachite se montre beaucoup plus favorable à la conservation du type aviaire initial à variété S prédominante. Aucun changement de caractères et de virulence n'a été constaté par nous pour la variété S d'origine aviaire, conservée sur milieu de Loewenstein, pendant trois ans et quatre mois à l'obscurité et à la température du laboratoire (souche O. N.).

RÉVERSIBILITÉ DE LA VARIÉTÉ S EN R
ET INVERSEMENT DE LA VARIÉTÉ R EN S,
POUR LES SOUCHES D'ORIGINE AVIAIRE.

Nous avons observé la réversibilité de la variété S du bacille aviaire en R, soit *in vitro* en nous servant de cultures sur pomme de terre glycinée, soit *in vivo* par l'ensemencement d'organes de poules, lapins, et cobayes inoculés avec la variété S.

In vitro, la transformation de S en R se produit par deux mécanismes nettement différents. A la surface de cultures pures du type S, sur pomme de terre glycinée, apparaissent d'emblée, après des semaines et des mois de séjour à la température du laboratoire, des colonies secondaires du type R. Nous avons constaté cette réversibilité à maintes reprises et même dans des cultures n'ayant passé qu'une seule fois sur pomme de terre glycinée et qui étaient demeurées pendant des années dans une armoire (souche O. N.). Le repiquage de ces colonies a fourni des cultures pures de type R comme on a pu le confirmer par leur innocuité pour la poule.

Dans le deuxième mécanisme, la variété R s'installe progressivement, au fur et à mesure des repiquages successifs des cultures de type S, sur pomme de terre glycinée. Tout d'abord, elles commencent par se plisser tout en conservant la consistance des colonies S; puis elles deviennent plus sèches en même temps qu'une grande partie des éléments deviennent R. Dans cet état, il suffit quelquefois d'un ou deux repiquages

sur pomme de terre pour avoir la transformation complète en cultures pures de type R. Ce deuxième mécanisme nous paraît le plus fréquemment observé comme le montrent les exemples suivants :

Une culture de la variété S de la souche E. L. avait conservé *in vitro* ses caractères pendant dix-sept passages (dix-sept mois) sur pomme de terre glycinée. A ce moment (dix-huitième passage), on constate que la culture devient moins luisante et humide, et qu'elle se plisse ; au dix-neuvième passage, la plus grande partie des éléments est devenue R. Au vingt-et-unième passage, la souche a un aspect R uniforme, et elle est devenue avirulente pour la poule.

La variété S de la souche O. N. maintient ses caractères après vingt-cinq passages sur pomme de terre glycinée. Au trentième passage, elle devient d'emblée R et conserve cet aspect aux passages suivants. L'inoculation aux animaux a montré qu'il s'agissait bien d'une réversibilité.

Le même résultat a été obtenu avec une culture de type S (souche O. N.) qui, repiquée après un séjour de trois ans à la température du laboratoire, avait conservé sa virulence initiale pour la poule et le lapin ; après huit passages sur pomme de terre glycinée, elle se plisse et se transforme en variété R, avirulente pour les animaux.

La réversibilité spontanée *in vitro* de R en S est nettement plus rare que la dissociation de S en R. Dans nos recherches, nous ne l'avons constatée que deux fois. Une culture de la variété R montre, au seizième passage sur pomme de terre glycinée et après un séjour de quatre mois à la température du laboratoire, plusieurs petites colonies S caractéristiques ; ces dernières isolées ont fourni une culture pure d'aspect S.

Le deuxième exemple concerne une culture en milieu de Sauton de la variété S, souche E. L., qui donna après six semaines d'étuve un voile rugueux de type R ; après trois passages sur pomme de terre glycinée, on obtint de nouveau une culture d'aspect S. Les inoculations aux animaux sensibles ont montré qu'il y avait bien eu successivement transformation de la variété S en R et de R en S.

La réversibilité de R en S *in vivo* est infiniment plus fréquente qu'*in vitro*. Au moment de l'isolement, les cultures R ino-

culées à des cobayes, poules et lapins, donnent presque à coup sûr des cultures pures de type S. Nous avons constaté ce phénomène avec nos 5 souches étudiées. La dissociation de R en S devient plus difficile au fur et à mesure que la souche a subi des repiquages successifs plus considérables. En effet, nous avons essayé de dissocier la variété R de la souche O. N. au quarante-et-unième passage sur pomme de terre glycinée; à trois reprises l'ensemencement d'organes de lapins et de poules, inoculés avec cette variété, n'a fourni que des cultures du type R. Sur vingt-quatre tubes ensemencés, on n'a pu compter, parmi des centaines de colonies d'aspect R, seulement deux colonies de type S dont l'identité fut confirmée par des repiquages ultérieurs.

La transformation de la variété S en type Ch. *in vitro* est très fréquente et très facile à obtenir surtout quand on applique le procédé que nous avons recommandé. Par des passages sur pomme de terre glycinée, on aboutit toujours avec cette variété Ch. à la variété R. Par contre, l'inoculation des animaux avec les cultures d'aspect Ch. donne presque constamment un mélange de colonies R et S qui, très rarement, sont accompagnées de quelques colonies Ch.

Les faits qui précèdent montrent en toute évidence que le phénomène de la dissociation, chez le bacille aviaire, est réversible.

Morton C. Kahn et Schwarzkoff [35] ont réussi avec le micromanipulateur de Chambers à isoler des cultures pures unicellulaires de R et S aviaires et ont obtenu à partir de ces cultures la transformation de R en S et *vice versa*.

Le même phénomène de réversibilité *in vitro* et *in vivo* a été aussi observé avec les souches aviaires, tout dernièrement par Birkhaug [36], à l'Institut Pasteur, en partant de cultures pures unicellulaires isolées par Wamoscher [37] à l'aide du micromanipulateur de Peterfi. Ces faits démontrent que les variétés R et S ne préexistent pas dans une même souche de bacilles aviaires comme l'ont prétendu certains auteurs.

D'un autre côté, nos expériences démontrent que chez le bacille aviaire la transformation de la variété S en R, ou inversement de R en S et Ch., ne s'opère pas par un changement brusque et définitif, autrement dit par « mutation ».

Malgré la stabilité remarquable de ces variétés sur les milieux

de culture, nous avons toujours pu arriver à obtenir cette réversibilité. Ainsi, nous avons observé la transformation d'une de nos variantes R, entretenue depuis quarante-trois passages sur pomme de terre glycinée, en variété S, bien qu'au cours de ces repiquages cette culture de type R se soit tout à fait adaptée à la vie saprophytique.

Dans ces conditions, la dissociation des bacilles tuberculeux aviaires se révèle comme un phénomène d'adaptation où les éléments différents en vitalité et en activité pathogène apparaissent chaque fois que les conditions du milieu de culture sont favorables à leur développement.

La connaissance de ce qui précède jette une nouvelle lumière sur le mécanisme intime de l'infection tuberculeuse aviaire et nous permet d'interpréter un grand nombre de faits jusqu'alors difficiles à expliquer tant en microbiologie qu'en pathologie expérimentale.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° Il résulte des faits et des constatations qui viennent d'être exposés que les souches de bacilles tuberculeux d'origine aviaire constituées au moment de leur isolement, exclusivement par la variété S, peuvent se dissocier *in vitro* ou *in vivo* en trois variétés R, S et Ch.

2° Ces variétés dissociées R, S et Ch. entretenues sur pomme de terre glycinée ont présenté une stabilité remarquable. Par réensemencement mensuel sur ce milieu, elles ont pu être conservées pendant des années sans que leurs caractères spécifiques se soient nullement modifiés. De toutes ces variantes, la R s'est révélée comme étant la plus stable *in vitro*.

3° Les éléments de la variété S sont plus courts et moins acido-résistants que ceux de la variété R. Les cultures de la variété S et Ch. croissent à la température du laboratoire (25 à 32°) dans les milieux ordinaires et à l'œuf-asparagine-vert malachite et dans le milieu liquide de Sauton, tandis que la variété R ne se développe qu'à l'étuve entre 37 et 42° et dans les milieux glycinés.

4° La variété S, après un séjour de quatre semaines d'étuve, alcalinise légèrement ou laisse même inchangé le milieu de

Sauton ajusté à un pH initial de 7,2 tandis que les variétés R et Ch. l'acidifient jusqu'à 5,6.

5° La variété S se développe en profondeur dans le bouillon glyceriné et dans le Sauton troublant uniformément ces milieux et formant à la surface un voile mince et lisse. Dans les mêmes milieux, la variété R ne pousse qu'en aérobiose stricte, formant un voile sec, ridé, qui remonte sur les parois des ballons et diffuse après un mois d'étuve un pigment légèrement jaunâtre.

6° Les cultures pures de type S, laissées à la température du laboratoire, se pigmentent fréquemment en se transformant en variété Ch.

7° La variété S d'origine aviaire s'est révélée très pathogène pour la poule en opposition avec la variété R qui s'est montrée relativement avirulente. Seules, les poules inoculées par voie veineuse, avec des doses massives de 1 à 10 milligrammes de la variété R au moment de l'isolement, meurent de longs mois après l'inoculation avec une forme chronique de tuberculose identique à l'infection naturelle des oiseaux. Les propriétés pathogènes de la variété Ch. pour la poule, sont identiques à celles de la variété R correspondante.

8° Les lésions histologiques du foie et de la rate des poules inoculées avec les variétés R, S et Ch. se sont révélées nettement différentes.

La variété S produit une tuberculose aiguë, congestive, toxique, qui se caractérise par la présence de nodules épithélioïdes formés de grosses cellules, type monocyttaire, à centre souvent caséeux et riches en bacilles acido-résistants.

Les variétés R et Ch. laissent intacte la structure générale des organes et les lésions spécifiques sont représentées par de petits nodules histiocyttaire, de rares cellules géantes avec un petit nombre de bacilles acido-résistants.

9° La variété S se révèle très virulente pour le lapin et la souris et produit une tuberculose aiguë, septicémique, type Yersin qui contraste avec la variété R qui, aux mêmes doses, est tout à fait inoffensive pour ces animaux.

10° Des essais de vaccination pratiqués chez le lapin, en utilisant la variété R (souche O. N.) nous ont permis de constater qu'elle lui confère un degré de résistance fort appréciable contre la variété S homologue très virulente pour cet animal.

11° L'étude des propriétés pathogènes des variétés R et S de la souche O. N. suivies, depuis leur isolement, pendant une durée de quatre années, nous a montré que la virulence de la variété S s'était conservée intacte pendant ce laps de temps. Au contraire, la variété R, qui, lors de son isolement tuberculisait la poule, n'a provoqué, après quarante-trois passages sur pomme de terre glycélinée, aucun trouble chez cet animal même après une année d'observation.

12° Par repiquage d'une souche de type S, laissée pendant trois ans et quatre mois à l'obscurité à la température du laboratoire, on a pu obtenir une culture fertile dont les caractères morphologiques et de virulence, pour la poule et le lapin, étaient identiques à ceux de la souche originale.

13° Les changements de virulence que subissent fréquemment les souches de bacilles aviaires, entretenues depuis longtemps dans les laboratoires, ont été expliqués par le fait que la variété initiale S, qui prédomine toujours dans les cultures d'origine aviaire récemment isolées, est remplacée par la variété R, au cours des réensemencements sur pomme de terre glycélinée.

14° Nous avons réussi à maintes reprises et assez aisément à transformer *in vitro* et *in vivo* la variété S du bacille aviaire en R.

La transformation de la variété R en S *in vitro* est plus rare et, au cours de nos recherches, n'a été observée que deux fois, tandis que *in vivo*, elle a été toujours obtenue à coup sûr, au moment de l'isolement. Cette réversibilité devient plus difficile au fur et à mesure des passages sur les milieux artificiels.

Ces faits démontrent que le phénomène de la dissociation, pour le bacille aviaire, est réversible.

Le même phénomène a été obtenu à partir de cultures pures, unicellulaires, ce qui prouve que les variétés R et S ne préexistent pas dans une même souche de bacilles aviaires.

Ces expériences montrent également que la transformation de S en R ou *vice versa* de R en S et Ch. ne s'opère pas par mutation.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LEHMANN et NEUMANN. *Atlas und Grundriss der Bakt.*, Berlin, 1916.
- [2] PREISZ. *Zent. f. Bakt.*, 35, 1904, p. 280.
- [3] NEISSER. *Zent. f. Bakt.*, 38, 1906, p. 98

- [4] MASSINI. *Arch. j. Hyg.*, **61**, 1907, p. 250.
- [5] BAERTHLEIN. *Arb. d. Kaiserl. Gesund.*, **40**, 1912, p. 433. *Zent. f. Bakt.*, **81**, 1918, p. 369.
- [6] ARKWRIGHT. *Journ. Path. and Bact.*, **23**, 1920, p. 358; *ibid.*, **24**, 1921, p. 36; *ibid.*, **25**, 1922, p. 104; *ibid.*, **29**, 1926, p. 318.
- [7] LEGROUX et MAGROU. *Ces Annales*, **35**, 1920, p. 417.
- [8] MANNINGER. *Zent. f. Bakt.*, **83**, 1919, p. 520.
- [9] DE KRUIF. *Journ. Amer. Med. Ass.*, **76**, 1921, p. 651.
- [10] COWAN. *Brit. Journ. Exp. Path.*, **3**, 1922, p. 187; *ibid.*, **4**, 1923, p. 241; *ibid.*, **5**, 1924, p. 226.
- [11] GRIFFITH. *Rep. on Public Health*, **18**, 1923, p. 4.
- [12] REIMANN et AMOSS. *Journ. Exp. Med.*, **91**, 1925, p. 587.
- [13] TOPLEY et AYRTON. *Journ. Hyg.*, **22**, 1921, p. 234.
- [14] GOYLE. *Journ. Path. a. Bact.*, **29**, 1926, p. 149.
- [15] HAMMERSCHMIDT. *Zent. f. Bakt.*, **92**, 1924, p. 443.
- [16] BALTEANU. *Journ. Path. a. Bact.*, **29**, 1926, p. 251.
- [17] JULIANELLE. *Journ. Exp. Med.*, **94**, 1926, p. 683.
- [18] SOULÉ. *Journ. Inf. Dis.*, **92**, 1928, p. 93.
- [19] SCHOCKAERT. *Journ. Méd. de Bruxelles*, **36**, 1929, p. 155.
- [20] BAERTHLEIN et TOJODA. *Zent. f. Bakt.*, **57**, n° 1, 1913, p. 281.
- [21] GILDEMEISTER. *Zent. f. Bakt.*, **86**, n° 513, 1921.
- [22] PETROFF, BLANCH et STEENKEN. *Proc. Soc. Exp. Biol. et Méd.*, **24**, 1927, p. 632. *Amer. Rev. Tuberc.*, **19**, 1929, p. 9. *Journ. of Exp. Med.*, **51**, 1930, p. 851.
- [23] WINN et PETROFF. *Journ. Exp. Med.*, **57**, 1933, p. 239.
- [24] A. SAENZ et L. COSTIL. *Soc. de Biol.*, **117**, 1934, p. 852.
- [25] A. SAENZ et L. COSTIL. *Soc. de Biol.*, **115**, 1934, p. 584.
- [26] A. SAENZ et L. COSTIL. *Soc. de Biol.*, **114**, 1933, p. 1263.
- [27] A. SAENZ et L. COSTIL. *Soc. de Biol.*, **112**, 1933, p. 1302.
- [28] A. SAENZ, M. SADETTIN et L. COSTIL. *Soc. de Biol.*, **117**, 1934, p. 1072.
- [29] A. BOQUET, A. SAENZ et L. COSTIL. *Soc. de Biol.*, **116**, 1934, p. 517.
- [30] A. SAENZ et L. COSTIL. *Soc. de Biol.*, **114**, 1933, p. 1260.
- [31] A. SAENZ. Co-rapport au Congrès de Varsovie, 1934; *Bull. de l'Union Intern. contre la Tuberc.*, **11**, 1935.
- [32] A. SAENZ et L. COSTIL. *Soc. de Biol.*, **116**, 1934, p. 836.
- [33] A. SAENZ. *Soc. de Biol.*, **113**, 1933, p. 1503.
- [34] A. SAENZ. *Bull. Association Diplômés Microb. de Nancy*, n° 10, 1935, p. 36.
- [35] MORTON, C. KAHN et SCHWARZKOPF. *Journ. of Bact.*, **25**, 1933, p. 157.
- [36] BIRKHAUG. *Ces Annales*, **54**, 1935, p. 19.
- [37] WAMOSCHER. *Bull. Soc. Franç. de Microscopie*, **111**, n° 1, 1931.
- [38] HADLEY. *The Journ. of Inf. Dis.*, **40**, 1927, p. 1 à 312.
- [39] VAN DEINSE et M. A. DOMANSKI. *Soc. de Biol.*, **119**, 1935, p. 1297.

RECHERCHES SUR LES ANTIGÈNES FIXATEURS DU BACILLE TUBERCULEUX

(TROISIÈME MÉMOIRE)

PURIFICATION DE L'HAPTÈNE LIPOÏDIQUE DE BACILLES TUÉS PAR LA CHALEUR, SÉPARATION D'AVEC LES PHOSPHATIDES, ÉLIMINATION DES IMPURETÉS AZOTÉES. ÉTUDE DE QUELQUES-UNS DES CARACTÈRES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA FRACTION ACTIVE

par MICHEL A. MACHEBOEUF, GEORGETTE LÉVY et MARGUERITE FAURE.

Dans deux mémoires antérieurs [1, et [2], nous avons déjà montré comment il était possible de rassembler en une seule fraction toutes les substances lipoïdiques présentant la propriété de fixer l'alexine en présence de sérums d'animaux tuberculeux. Nous avons ensuite montré [3] que cette fraction pouvait être considérée comme un mélange de fractions d'activités et de constitutions dissemblables.

Nous avons poursuivi ces recherches en essayant d'obtenir à un degré de pureté élevé la ou les substances actives afin d'en étudier la constitution chimique, les propriétés physiques et l'activité biologique ; ce sont ces essais que nous rapportons dans le présent mémoire.

La fraction active brute semblait correspondre par ses diverses propriétés et par son obtention même à des phosphatides, elle doit même contenir la plus grande partie des phosphatides du bacille ; devait-on rapporter l'activité haptène à un phosphatide ou à l'ensemble des phosphatides, ou au contraire à une substance différente des phosphatides, mais les accompagnant dans la fraction active brute ?

Ce premier problème fixa d'abord notre attention et nous avons eu la chance de pouvoir le résoudre en séparant les phosphatides qui sont inactifs d'avec une fraction active qui n'est pas un phosphatide au sens habituel du terme (phosphoaminolipide). Nous avons poursuivi plus loin encore la purification

de la fraction active et nous avons étudié certaines de ses propriétés physicochimiques, nous avons déjà pu obtenir en outre quelques précisions sur sa constitution chimique.

Matière première. — Nous avons utilisé des corps bacillaires tués par la chaleur, provenant du service de fabrication de la tuberculine de l'Institut Pasteur. (Voir mémoires antérieurs).

Obtention de la fraction active brute. Essais préliminaires.

Nous avons cherché tout d'abord la technique d'extraction des haptènes lipoïdiques qui nous donnerait le meilleur rendement et nous avons constaté que pour éviter des pertes assez notables en haptènes lipoïdiques, il fallait éviter de laver à l'eau les corps bacillaires morts. Les eaux de lavage entraînent, en effet, un peu d'haptènes, et voici une expérience qui met ce fait en évidence.

INFLUENCE DU LAVAGE DES CORPS BACILLAIRES.

100 grammes de corps bacillaires sont lavés avec de l'eau distillée par agitation énergique suivie de centrifugation ; après cinq lavages, on étudie séparément les haptènes lipoïdiques contenus d'une part dans les eaux de lavage et, d'autre part, dans les corps bacillaires lavés. Des corps bacillaires on extrait une fraction active brute totale pesant 290 milligrammes et dont l'activité haptène était 400 à 500 (1). Les eaux de lavage sont d'autre part évaporées par distillation sous le vide et le résidu est traité par l'alcool bouillant. La solution alcoo-

(1) Comme dans nos précédents mémoires (2 et 3), nous avons indiqué l'activité de chaque fraction par un nombre. Ce nombre correspond à la dilution limite à laquelle on peut porter une solution-mère contenant par centimètre cube 1 milligramme de la fraction considérée pour que 0 c. c. 25 de la dilution fixe encore complètement l'alexine dans les conditions arbitraires que nous nous sommes fixées. Nous avons chaque fois étalonné nos conditions de travail par rapport à une même solution étalon d'« antigène méthylique » de BOQUET et NÈGRE dont les substances constitutives avaient une activité de 100. Si donc l'activité de l'une de nos fractions est désignée par le nombre 1.500, par exemple, cette fraction est, à poids égal, quinze fois plus active que les substances constituant l'« antigène méthylique » de BOQUET et NÈGRE.

lique présente une activité haptène assez intense qui est due en partie au moins à des lipides. Nous avons pu, en effet, séparer de cette solution 40 milligrammes de lipides, solubles dans le chloroforme et dans l'éther anhydre, mais insolubles dans l'acétone et dont l'activité était 1.000. Les eaux de lavage des bacilles morts avaient donc entraîné plus de 20 p. 100 des lipides actifs.

Ces substances lipoidiques haptènes entraînées dans les eaux de lavage sont perdues lorsqu'on lave les corps bacillaires morts et le rendement est ainsi notablement abaissé.

INFLUENCE DU LAVAGE A L'EAU DES SOLUTIONS ÉTHÉRÉES DES SUBSTANCES LIPOÏDIQUES.

Nous avons étudié l'influence sur le rendement de tous les stades des opérations conduisant à l'obtention de la fraction active brute, et nous avons au cours de cette étude fait une constatation assez inattendue : si, pour éliminer les substances non lipoidiques, on lave la solution éthérée des lipides actifs par contact avec de l'eau, on perd de très importantes quantités de substances actives qui abandonnent la phase éthérée pour passer dans la phase aqueuse. Suivant les conditions de cette opération, les quantités de substances actives passant ainsi dans l'eau sont assez variables, mais toujours très importantes. Nous reviendrons sur ce fait avec plus de précision dans la suite du présent mémoire ; nous citerons seulement ici pour fixer les idées, l'exemple suivant : lorsque les substances non lipoidiques sont éliminées en milieu anhydre par action de l'éther anhydre et du chloroforme, on a un rendement en fraction active brute de 4 grammes environ par kilogramme de bacilles (activité 700 à 800), tandis que si l'on agite les solutions éthérées avec de l'eau pour leur enlever les substances hydrosolubles, le rendement est variable et généralement inférieur à 1 gramme (activité 500 à 700). Nous avons naturellement pensé tout d'abord que les haptènes qui passaient dans la phase aqueuse étaient des substances non lipoidiques ; il n'en est rien, car l'activité fixatrice des phases aqueuses relève de substances lipoidiques solubles dans l'éther et dans le chloroforme et donnant par hydrolyse des acides gras. Extraire par

l'eau, et en aussi grande abondance, des lipides contenus dans une phase éthérée nous semblait paradoxal ; ce phénomène, cependant, s'est éclairé pour nous au cours d'une étude effectuée sur des fractions purifiées ; nous rapportons cette étude dans un chapitre ultérieur du présent travail. (Voir p. 564).

Technique nouvelle d'obtention de la fraction haptène brute.

Les constatations préliminaires que nous venons de résumer ici nous ont, après bien des tâtonnements, conduits à modifier notre précédente technique d'obtention de la fraction active brute ; nous sommes parvenus à un très haut rendement en évitant tout lavage aqueux des bacilles et des substances lipoidiques. Voici la technique qui nous a semblé la meilleure et à laquelle nous nous sommes arrêtés : les corps bacillaires sont séparés du liquide de culture concentré (tuberculine brute) par filtration, puis passage à la presse à main.

Les corps bacillaires sont mis dans un assez grand volume d'acétone et soumis à une agitation modérée ; le lendemain, l'acétone est renouvelé. Pendant cinq jours encore les bacilles sont ainsi épuisés par de l'acétone qui est renouvelé en tout quatre ou cinq fois.

L'acétone a déshydraté les bacilles et leur a enlevé des lipides inactifs et d'autres substances inactives (pigments, etc....).

Les corps bacillaires ainsi traités par l'acétone sont épuisés, sous atmosphère d'azote, par de l'alcool éthylique concentré (96°) bouillant. Les solutions éthyliques filtrées sont évaporées par distillation dans le vide jusqu'à ce que le résidu soit un *sirop très épais*. Cet aspect du résidu est dû au glycérol du milieu de culture que l'acétone n'avait pas enlevé, mais que l'alcool a dissout.

Le résidu sirupeux est additionné de quatre volumes d'alcool absolu bouillant ; on refroidit à la température ordinaire, puis on élimine l'insoluble après l'avoir rincé avec un peu d'alcool absolu. Les solutions alcooliques sont additionnées du double de leur volume d'éther, ce qui précipite du glycérol et des substances non lipoidiques. La phase éthérée est séparée par décantation. Dans ces conditions (alcool absolu, éther anhydre), la

phase glycérique est à peu près anhydre et elle n'entraîne pas trace de substances actives.

La solution éthéro-alcoolique est évaporée par distillation dans le vide, le résidu pâteux est desséché, puis épuisé trois fois par de l'éther anhydre qui laisse insolubles encore du glycérol et quelques traces de substances non lipoidiques et inactives.

La solution éthérée est concentrée dans le vide jusqu'à un volume assez réduit, elle est ensuite additionnée d'acétone en quantité suffisante pour qu'un excès ne fasse plus apparaître de précipité. Le mélange est porté à la glacière jusqu'au lendemain. Le précipité est recueilli, puis repris par du chloroforme en petite quantité ; la solution est centrifugée à grande vitesse, puis filtrée. La solution chloroformique parfaitement limpide est additionnée de deux volumes d'acétone et placée à la glacière. Le précipité obtenu est la fraction active brute qui nous a servi de point de départ. Le rendement est excellent ; à partir de 3 kilogr. 5 de corps bacillaires humides, nous obtenons ainsi 14 grammes environ d'une fraction dont l'activité est voisine de 700 ou 800, alors que l'activité des substances totales contenues dans l'antigène méthylique de Boquet et Nègre, qui nous servait de terme de comparaison, est au voisinage de 100.

Nous avons, pour simplifier le texte, appelé γ cette fraction brute initiale d'activité haptène 700 à 800. (Teneur en phosphore = 3,61 p. 100).

Fractionnement de la fraction active brute.

Après avoir essayé avec plus d'insuccès que de succès diverses méthodes pour fractionner γ , nous avons constaté qu'un fractionnement méthodique bien conduit au moyen d'alcool méthylique rectifié pourrait amener à de bons résultats, et nos essais préliminaires nous ont conduits à opérer ainsi :

Toutes les opérations furent effectuées autant que possible à l'abri de l'air, toutes les concentrations furent effectuées dans le vide.

L'ensemble de γ est épuisé, à une température voisine de 40° par de petites portions d'alcool méthylique ; l'agitation doit

être énergique et le contact entre l'alcool et la masse à épuiser doit être prolongé quelques minutes chaque fois. Les premières portions d'alcool se pigmentent nettement en jaune orangé brunâtre et dissolvent d'assez grandes quantités de substances. Le résidu non dissous se décolore de plus en plus et les traitements successifs par l'alcool méthylique tiède lui enlèvent de moins en moins de substances. Lorsque l'alcool n'enlève plus que de petites quantités à peu près constantes de substances, on cesse les épuisements et le résidu non dissous est la fraction γ_1 . Les solutions méthyliques sont concentrées jusqu'à demi-volume environ et refroidies à la température de 15° ; un précipité n° 1 apparaît, on le recueille. La solution-mère est encore concentrée au quart de son volume, puis refroidie à 0° . L'abondant précipité n° 2 apparu est recueilli.

Le précipité n° 1 est épuisé par de petits volumes d'alcool méthylique tiède (40°C), qui laisse un résidu n° 1'; les solutions filtrées servent à épuiser à $+40^\circ$ le précipité n° 2; il reste un insoluble, le n° 2', qui est traité encore deux fois par de l'alcool méthylique neuf, puis réuni à 1'. Les solutions-mères sont concentrées, puis refroidies à 0° , filtrées et réunies aux solutions-mères primitives.

On renouvelle méthodiquement les opérations jusqu'à ce que les solutions-mères rassemblées et concentrées à un faible volume, puis refroidies à 0° , ne laissent plus rien précipiter. Dans ces solutions-mères sont rassemblées les substances les plus solubles dans l'alcool méthylique froid (0°C). Cette fraction que contiennent les solutions-mères concentrées et refroidies est dénommée γ_3 . Les divers précipités qui se sont déposés par concentration et refroidissement ont été traités méthodiquement et divisés en somme en deux parties: la moins soluble à $+40^\circ \text{C}$ que l'on a rassemblée sous la dénomination de γ_1 et la plus soluble à $+40^\circ \text{C}$, mais insoluble à 0°C qui est γ_2 . Nous avons ainsi obtenu quatre fractions:

γ_1 et γ_1' sont très peu solubles dans l'alcool méthylique tiède ($+40^\circ \text{C}$).

γ_2 est un peu plus soluble à $+40^\circ \text{C}$, cette fraction intermédiaire est peu abondante.

γ_3 est très soluble dans l'alcool méthylique, même refroidi à 0°C .

Cette longue série de fractionnements nous a conduits à un premier résultat intéressant : la fraction γ_3 , la plus soluble et la plus abondante, est pratiquement dénuée de toute activité haptène dans la réaction de fixation de l'alexine.

γ_1 et γ_4 les moins solubles à $+ 40^\circ \text{C}$ sont extrêmement actives.

γ_2 , fraction intermédiaire impure, présente une activité encore assez élevée, mais cependant bien inférieure à celles de γ_1 et γ_4 .

Dans le tableau n° 1, nous avons rassemblé les résultats obtenus au cours d'un fractionnement de ce type effectué sur un poids de 4 gr. 880 de la fraction γ .

TABLEAU I.

	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	FRACTION brute initiale
Poids p. 100 de γ .	19	12	50	17	»
Activité	800-900	400	30 à 40	1.000	700
Phosphore p. 100.	3,62	2,72	3,79	4,01	3,82
Azote p. 100 . . .	0,35	1,12	1,91	0,25	1,1
Point de fusion .	187-190	135-145	200-205	190-195	»

Divers faits intéressants apparaissent à la lecture de ces résultats :

1° *Toutes les fractions sont très riches en phosphore et toutes le sont à peu près autant.*

2° *Les fractions sont d'autant plus pauvres en azote qu'elles sont plus actives*, et la fraction γ_1 , la plus active, est si pauvre en azote qu'il est impossible d'y doser cet élément avec précision, même par une méthode très sensible comme le micro-kjeldahl selon Parnas et Wagner.

3° *Les teneurs en phosphore et en azote de la fraction γ_3 sont celles d'un phosphatide banal tel que la lécithine brute (lécithine + céphaline) de jaune d'œuf.* Nous verrons d'ailleurs bientôt que γ_3 est un mélange de phosphoaminolipides voisins de la lécithine et de la céphaline d'œuf. *La fraction γ_3 est pratiquement inactive du point de vue de la fixation de l'alexine*, et ce fait est très intéressant, car il montre que *ce n'est pas aux phosphatides du bacille qu'il faut rapporter l'activité haptène des substances lipoidiques.* C'est au contraire à des fractions extrêmement pauvres en azote (γ_1 et γ_4) qu'est due cette activité.

4° Les fractions γ_1 et γ_4 , très peu solubles dans l'alcool méthyl-

lique tiède (ou même chaud), sont aussi identiques que l'on peut le souhaiter après un simple fractionnement comme celui que nous avons pratiqué jusqu'ici. Ces deux fractions se rapprochent en effet par tous leurs caractères : aspect, très faible solubilité dans l'alcool méthylique même à chaud, teneur en azote et en phosphore, point de fusion et activité haptène.

γ_4 est peut-être un peu plus pure que γ_1 qui est obtenue à l'état de simple fraction jamais solubilisée, tandis que γ_1 a été solubilisée d'abord dans le grand volume de la totalité des solutions-mères.

γ_1 et γ_4 sont encore semblables par la façon dont elles se comportent lorsqu'on les recouvre d'eau; elles se gonflent l'une et l'autre rapidement et passent ensuite par une brève agitation en émulsion très fine et stable.

Nous avons donc réuni γ_1 et γ_4 pour la suite des recherches et la fraction si active constituée par leur ensemble a été appelée *fraction G*.

La fraction γ_2 semble être une fraction intermédiaire dans laquelle se sont rassemblées des substances de trois types différents :

a) Des substances haptènes phosphorées non azotées telles que celles constituant γ_1 et γ_4 .

b) Des substances inactives comme haptènes, phosphorées et azotées, telles que celles constituant γ_3 .

c) Des substances non phosphorées telles qu'il doit encore s'en rencontrer en petite quantité dans γ_1 , à côté des substances actives.

La fraction γ_2 est d'ailleurs la moins abondante de toutes; nous l'avons pour l'instant laissée de côté et nous avons fait porter notre étude sur les fractions G et γ_3 .

La fraction G ($\gamma_1 + \gamma_4$) qui représentait 36 p. 100 de la substance initiale était extrêmement active comme haptène, riche en phosphore, très pauvre en azote et très peu soluble dans l'alcool méthylique même à chaud.

La fraction γ_3 qui représentait 50 p. 100 de la substance initiale était pratiquement inactive comme haptène, riche en phosphore, riche en azote, très soluble dans l'alcool méthylique même à froid (0° C). Ces deux fractions sont donc essen-

tiellement différentes, et les seuls caractères qui les rapprochent sont : 1° leurs teneurs élevées en phosphore, et 2° leur très faible solubilité dans l'acétone. C'est à cette dernière propriété qu'était dû le rassemblement de ces deux fractions si dissemblables dans la fraction γ primitive.

Étude de la fraction purifiée G.

La fraction G fut desséchée avec soin, puis reprise par de l'éther qui élimina encore quelques milligrammes de poussières et de substances non lipidiques absolument inactives.

Nous ne pouvions pas espérer que la fraction G soit une substance pure ; nous avons donc poursuivi l'isolement des substances actives qu'elle contenait, et pour cela nous nous sommes adressés à une technique décrite dans un précédent mémoire [3] où elle nous avait déjà conduits à une étape de purification : précipitation fractionnée à basse température dans un mélange de chloroforme et d'alcool méthylique.

Pour cela, la fraction G fut dissoute dans le plus petit volume possible de chloroforme (11 cent. cubes pour 1 gr. 11), puis la solution fut additionnée progressivement d'un volume d'alcool méthylique égal à celui du chloroforme, et le mélange fut porté à la glacière. Le lendemain, on recueille par filtration à 0° un précipité pesant 0 gr. 354. Cette sous-fraction dite fraction G_1 présente une activité haptène extrêmement élevée, 1.500, tandis que les substances restées en solution (fraction G_2) ont une activité très inférieure : 400.

L'analyse de ces deux fractions nous a donné les résultats suivants :

TABLEAU II.

	FRACTION G_1 (précipité)	FRACTION G_2 (solution-mère)
Poids en gramme.	0,354	0,756
Activité haptène.	1.500	400
Phosphore p. 100	3,39	3,96
Azote p. 100	Moins de 0,25.	0,40

La précipitation méthylique en milieu chloroformique à basse température (0°) appliquée à une fraction purifiée telle

que G sépare donc d'emblée deux sous-fractions extrêmement différentes.

L'insolubilité de G_1 dans ces conditions n'est pas totale ; nous avons en effet constaté que la quantité de G_1 obtenue diminue si l'on augmente les volumes des solvants utilisés. Ceci permet d'expliquer l'activité assez notable encore de G_2 par la présence dans cette fraction d'un peu de G_1 . Il se peut aussi d'ailleurs que G_2 précipite partiellement dans les conditions où nous nous sommes placés. La fraction G_1 , malgré sa si haute activité, ne doit donc pas être encore considérée comme une substance pure. Les seuls caractères qui peuvent donc avec certitude se déduire de l'étude de G_1 pour être appliqués aux substances actives sont des caractères négatifs ; mais parmi ceux-ci, il en est deux qui sont extrêmement importants :

1° *La fraction G_1 dont l'activité haptène est si considérable dans la réaction de fixation de l'alexine, ne présente aucune trace de propriétés haptènes de précipitation ;* si l'on mélange, en effet, une suspension aqueuse même concentrée (0 milligr. 5 par centimètre cube) de G_1 avec du sérum anti-BCG., ou un sérum d'animal tuberculeux, le mélange est stable et il n'apparaît aucun précipité. Cette spécificité du caractère haptène est ici extrêmement nette et intéressante : 0 c. c. 25 d'une solution contenant par centimètre cube 1/1.500 de milligramme suffisent à fixer 2,5 doses minima actives d'alexine, tandis qu'une solution 750 fois plus concentrée de la même fraction G_1 ne donne pas la moindre précipitation si on la met en contact avec le sérum qui a servi pour l'étude de la fixation de l'alexine. Les substances lipoidiques des bacilles tuberculeux contiennent cependant des haptènes de précipitation très actifs qui sont actuellement à l'étude dans notre laboratoire et sur lesquels nous espérons revenir bientôt.

Quoi qu'il en soit, on peut affirmer que les substances actives comme haptènes de déviation sont inactives comme haptènes de précipitation.

2° *La fraction G_1 , qui est un haptène extrêmement actif, n'est pas antigène.* Injectée au lapin, elle ne produit, en effet, pas l'apparition d'anticorps de fixation, ni de précipitation. Des expériences sont en cours par lesquelles nous cherchons à savoir si, par union avec un protéide hété-

rogène, notre haptène G_1 , devient un antigène capable de faire naître des anticorps spécifiques. Nous espérons revenir ultérieurement sur ce sujet.

Quoi qu'il en soit, nous pouvons conclure que *les substances actives de la fraction G_1 sont des haptènes de fixation au sens le plus strict et qu'ils ne sont pas des antigènes complets sans union préalable avec un protéide hétérogène.*

En dehors des deux conclusions absolues auxquelles nous venons d'aboutir, l'étude de la fraction G_1 , qui n'est pas encore une substance chimiquement pure, ne nous permet pas de conclusion positive sur la nature des substances actives; nous pouvons cependant penser que les substances actives doivent être phosphorées, car toujours les fractions les plus actives se sont montrées très riches en phosphore, mais ceci n'est qu'une hypothèse qui demande une vérification ultérieure.

Les fractions les plus actives sont toujours les moins riches en azote; il est donc probable que les substances actives ne sont pas azotées. Nous reviendrons plus loin sur ce point.

Une autre très intéressante conclusion va découler de l'étude qui va suivre de la fraction γ_3 , car nous allons voir que les phosphatides proprement dits du bacille tuberculeux chauffé ne présentent aucune activité haptène de déviation.

Étude de la fraction γ_3 .

Nous avons vu ci-dessus comment par un fractionnement méthodique dans l'alcool méthylique à diverses températures on parvenait à séparer d'avec les fractions actives une fraction phosphorée et azotée inactive que nous avons désignée par l'indice γ_3 .

Cette fraction γ_3 chez laquelle le sérum d'animaux tuberculeux ne révèle aucune activité haptène présente cependant un intérêt biologique et biochimique assez grand. Elle représente en effet les phosphoaminolipides du bacille, les teneurs en phosphore, en azote et en acides gras correspondant absolument aux teneurs que l'on trouve en analysant les phosphatides du jaune d'œuf, par exemple (lécithine + céphaline). L'azote s'y

trouve comme dans les phosphatides de l'œuf sous deux états, car dans les produits d'hydrolyse de γ_3 on trouve :

1° Une amine primaire titrable par la méthode de Sørensen ou par celle de Van Slyke, et non précipitable par l'acide phosphotungstique (cholamine très probablement).

2° Un hydrate d'ammonium quaternaire (ou amine secondaire ou tertiaire) précipitable par l'acide phosphotungstique et par l'iode ioduré. Il faut cependant remarquer que cet azote n'est pas à l'état de choline, mais d'une autre base azotée plus complexe que nous étudions actuellement.

Qu'important, d'ailleurs, pour ce qui nous occupe ici aujourd'hui, de plus amples détails sur la nature des bases azotées entrant dans les molécules des phosphatides qui constituent γ_3 , il s'agit bien de phosphoaminolipides, comme le démontrent surabondamment toutes les propriétés physiques et chimiques. Un fait capital apparaît donc : l'activité haptène des lipides n'appartient pas aux phosphoaminolipides (γ_3), mais à d'autres substances (G_1). L'activité haptène des lipides de G_1 est énorme. Il faut $1/5$ de millièrne de milligramme de la fraction G_1 pour fixer totalement 2 doses $1/2$ minima actives d'alexine, tandis que les phosphoaminolipides qui sont rassemblés dans la fraction γ_3 n'ont pas d'activité notable.

De tous nos essais rapportés dans le présent mémoire, ou dans ceux qui l'ont précédé, il semble que l'on puisse conclure en outre, sans une absolue certitude, mais avec une grande probabilité que parmi toutes les substances lipoïdiques du bacille tuberculeux, il en est une seule qui possède l'activité haptène de fixation. Dans tous nos fractionnements, en effet, nous sommes toujours parvenus à rassembler pratiquement toute l'activité haptène en une seule fraction. Si le caractère haptène appartient à plusieurs substances, il s'agit en tout cas de substances tellement voisines les unes des autres que les nombreux fractionnements que nous avons pratiqués sont incapables de les séparer. L'activité haptène n'appartient donc pas à divers groupes de substances lipoïdiques, mais à un seul groupe très limité de substances, et ce fait nous a paru fort intéressant; il ajoute d'ailleurs de l'intérêt aux essais que nous poursuivons en vue d'isoler la substance active.

Essais d'élimination complète des traces d'azote contenues dans les fractions actives.

Nous venons de voir que dans tous nos fractionnements c'était toujours la fraction la plus pauvre en azote qui était la plus active. Nous avons donc cherché à savoir si la ou les substances actives étaient elles-mêmes des substances rigoureusement privées d'azote. L'élimination complète des traces de substances azotées est extrêmement pénible, car les phosphoaminolipides inactifs et azotés (fractions γ_3) ne se séparent qu'avec beaucoup de difficulté d'avec les fractions actives, surtout lorsqu'ils ne s'y trouvent qu'en faible proportion.

Nous avons repris sur la fraction G_1 (0,25 p. 100 d'azote) une série de fractionnements par l'alcool méthylique, analogues à ceux qui à partir de γ nous avaient conduits à l'obtention des fractions $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$, mais nous avons opéré un peu différemment. Nous avons épuisé la fraction G_1 par de l'alcool méthylique chaud en quantité suffisante pour la dissoudre à peu près complètement. Il en est resté un très faible résidu insoluble n° 1 (quelques milligrammes) et inactif. Nous avons ajouté assez d'alcool méthylique pour que, par refroidissement à la glacière, il n'apparaisse qu'un très léger précipité.

Ce précipité n° 2 fut recueilli et les solutions-mères furent concentrées sous vide jusqu'au tiers environ de leur volume, puis refroidies à 0°. Le précipité apparu (n° 3) fut recueilli ; ses solutions-mères furent encore concentrées au tiers de leur volume et refroidies, ce qui permit d'obtenir un précipité n° 4. Les solutions-mères finales furent évaporées à sec et leur contenu fut dénommé n° 5. Les activités furent déterminées ainsi que les teneurs en azote. Voici les résultats de ces essais :

TABLEAU III.

	POIDS en milligrammes	AZOTE p. 100	PHOSPHORE p. 100	ACTIVITÉS RELATIVES (unités arbitraires)
N° 1 . . .	5	"	"	1
N° 2 . . .	2	"	"	6
N° 3 . . .	116	< 0,25	2,9	10
N° 4 . . .	84	< 0,13	3,6	12
N° 5 . . .	66	0,45	4,0	9,5 à 10

Ici encore la fraction la plus active n° 4 est celle qui est la plus pauvre en azote et sa teneur en azote est si faible que sa détermination n'a pas été possible sur les quantités dont nous disposions. Il est d'ailleurs à noter que les activités des quatre fractions ainsi que leurs teneurs en phosphore sont extrêmement voisines, il faut donc conclure que l'alcool méthylique n'est plus capable de pousser plus avant le fractionnement. Il permet seulement de concentrer un peu les impuretés azotées dans la fraction la plus facilement soluble à froid, mais le rendement d'une purification plus complète par ce solvant serait très mauvais.

Nous avons cherché à déceler l'azote dans notre fraction la plus pure par diverses méthodes qualitatives sans pouvoir, sur les quantités dont nous disposions, affirmer ou nier complètement la présence ou l'absence de traces d'azote, la sensibilité de ces méthodes n'étant pas suffisante. Ce que nous pouvons affirmer, c'est que la purification des fractions actives a fait régulièrement baisser la teneur déjà faible en azote, tandis que s'élevait l'activité. Cette teneur en azote s'est abaissée à tel point que si l'on voulait attribuer l'activité haptène à des fractions phosphatidiques azotées encore contenues dans nos fractions les plus pures, il faudrait admettre que ces substances ont une activité bien peu vraisemblable et telle que plus de 200.000 doses minima d'alexine soient fixées par 1 milligramme de substance; nous avons d'autre part vu que tous les phosphatides azotés que nous avons pu extraire et purifier un peu sont dénués d'activité. *Il ne nous semble donc pas téméraire de conclure que les substances actives sont des substances non azotées.*

Essais d'élimination des petites quantités de glucides contenues dans les fractions actives.

Dans notre premier travail sur les lipides du Bacille tuberculeux (1) nous avons dit (p. 292), que la fraction haptène

(1) M. MACHEBOEUF, G. LÉVY, N. FETHKÉ, J. DIERYCK et A. BONNEFOI : Études chimiques sur le Bacille tuberculeux. 1^{er} Mémoire. Essais préliminaires d'extraction et de fractionnement des substances lipoidiques de corps bacillaires tués par la chaleur. Ces *Annales*, 52, 1934. p. 277 à 308.

contenait des glucides, car par hydrolyse acide elle donnait 6,25 p. 100 de sucres réducteurs. Nous avons également montré que ces oses se trouvaient dans la fraction active à l'état d'osides non réducteurs, car la saponification alcaline de cette fraction libère une matière hydrosoluble non réductrice qui par hydrolyse acide donne des oses.

Nous avons dans le présent travail suivi également pas à pas le sort de ces dérivés glucidiques au cours des fractionnements que nous avons effectués et nous avons été amenés à conclure que *ces dérivés osidiques ne font pas partie de la substance haptène active*, ils l'accompagnent seulement, bien qu'il soit très difficile de les en séparer.

La fraction G₁ étudiée ci-dessus, qui avait été obtenue après une assez longue série de fractionnements et de purifications, contenait encore en quantité assez notable des dérivés osidiques, car après son hydrolyse acide le pouvoir réducteur mesuré correspondait encore à 7,3 p. 100 environ de sucres réducteurs (calculés en glucose). Les dérivés osidiques n'avaient donc pas été éliminés par nos fractionnements ; bien au contraire, ils s'étaient concentrés un peu dans la fraction active, et l'on pouvait craindre que l'activité haptène de nos fractions lipoidiques actives soit due non pas à des lipides, mais à des glucides qui les souillaient ; il n'en est rien, car au cours du fractionnement ultérieur auquel nous avons soumis G₁, nous avons constaté que la fraction la plus pauvre en glucides était la plus active, tandis que la plus riche en glucides était notablement moins active.

Voici d'ailleurs (tableau 4) les résultats de ces mesures.

TABLEAU IV.

	SUCRES RÉDUCTEURS libérés par hydrolyse p. 100	ACTIVITÉS HAPTÈNES relatives des fractions
Fraction n° 3	12,2	10
Fraction n° 4	3,3	12
Fraction n° 5	4,5	9,5 à 10

Les glucides se rassemblent donc dans la fraction la moins soluble (n° 3), qui est moins active que la fraction un peu plus soluble n° 4). Cette fraction n° 4, la plus active, ne contient plus

que de très faibles quantités d'oses [3 p. 100 environ] (1).

Notons d'ailleurs que l'insolubilité du dérivé glucidique dans l'alcool méthylique froid est loin d'être nulle, puisque la fraction n° 4 qui représente le contenu des eaux-mères donne encore à l'hydrolyse 4,5 p. 100 de sucres réducteurs.

Si nous rapprochons ces résultats de ceux du tableau n° III, nous pouvons conclure que la fraction G₁ contenait encore à côté des haptènes actifs deux types d'impuretés inactives :

1° Des lipides azotés qui tendent à se rassembler dans les fractions les plus solubles dans l'alcool méthylique froid (fraction n° 5).

2° Des substances donnant par hydrolyse des oses ; ces substances tendent à se rassembler dans les fractions les moins solubles dans l'alcool méthylique froid (fraction n° 3).

Constitution chimique de la fraction active la plus purifiée.

La fraction n° 4, la plus active et la plus purifiée de toutes celles que nous avons pu obtenir jusqu'ici, contient encore, nous allons le voir, de petites quantités d'impuretés inactives : 1° 0,13 p. 100 d'azote, ce qui correspond à 6 ou 7 p. 100 de phosphoaminolipides et 3,3 p. 100 de sucres réducteurs libérables par hydrolyse.

Ces deux impuretés dont le total représente à peu près 10 p. 100 de la fraction n° 4 doivent pouvoir être éliminées en reprenant avec patience des fractionnements dans l'alcool méthylique, mais il faut pour cela partir d'une quantité de matière première bien plus grande encore que celle que nous avons mise en œuvre ici. Nous poursuivons actuellement ce travail. Il est possible d'ailleurs que d'autres impuretés encore inconnues de nous se trouvent encore dans notre fraction la plus pure, mais il ne semble pas qu'elles soient très abondantes, car le dernier fractionnement qui a rassemblé dans la fraction de tête la plus grande partie des osides, et dans la

(1) Notons que dans les fractions purifiées étudiées ici comme dans la fraction brute B₂ étudiée dans notre 1^{er} Mémoire, les oses sont à l'état d'osides non réducteurs, car la saponification alcaline libère une substance hydrosoluble non réductrice qui, par hydrolyse acide, donne des oses.

fraction de queue une notable partie des traces d'azote, ne semble pas avoir différencié autrement les fractions; les légères différences d'activité entre les fractions n° 3, n° 4 et n° 5 peuvent parfaitement s'expliquer par les teneurs différentes en les deux impuretés connues, osides d'une part et phosphoaminolipides d'autre part.

Nous avons également étudié dans ces trois fractions les produits de saponification alcaline et nous avons constaté : 1° que seule la fraction n° 3 contenait un insaponifiable solide ; elle le contenait d'ailleurs à l'état de trace ; cet insaponifiable provient donc d'une très faible impureté qui ne se trouve plus du tout dans les autres fractions, et ce fait nous permet de conclure avec certitude que les lipides actifs ne sont pas des dérivés d'un stérol ou d'un insaponifiable éthérosoluble quelconque ; 2° les quantités d'acides gras libérés par saponification (voisines de 60 p. 100) ne diffèrent que dans les limites compatibles avec les variations explicables par les impuretés connues ; il en est de même des teneurs en phosphore.

Voici d'ailleurs l'ensemble des résultats :

TABLEAU V.

FRACTIONS	POIDS en milligrammes	ACTIVITÉS HAPTÈNES relatives	PHOSPHORE p. 100	AZOTE p. 100	INSAPONIFIABLE p. 100	SUCRES RÉDUCTEURS après hydrolyse p. 100
N° 1. . .	5	1				
N° 2. . .	12	6				
N° 3. . .	116	10	2,9	0,25	2,4	12,2
N° 4. . .	84	12	3,6	0,13	0	3,3
N° 5. . .	66	9,5 à 10	4,0	0,45	0	4,5

En se rappelant que les phosphatides inactifs (fraction γ) contiennent 1,9 p. 100 d'azote, on peut calculer approximativement pour les fractions n° 3, n° 4 et n° 5 leurs teneurs en phosphatides inactifs d'après leurs teneurs en azote. On peut donc, semble-t-il, résumer ainsi la constitution de chacune des trois fractions.

TABLEAU VI.

FRACTIONS	GLUCIDES p. 100	PHOSPHOAMINOLIPIDES p. 100	INSAPONIFIABLE p. 100	AUTRES SUBSTANCES p. 100	ACTIVITÉS RELATIVES
N° 3	12,2	43	2,4	73	10
N° 4	3,3	7	0	90	12
N° 5	4,5	24	0	71	9,5 à 10

Les nombres 73, 90, 71 sont entre eux aussi exactement qu'il est possible de le souhaiter dans le même rapport que les nombres 10, 12 et 9,7 qui représentent les activités relatives des trois fractions. Dans les trois fractions, par conséquent, les substances qui ne sont ni des glucides, ni des phosphoaminolipides ont, autant qu'il est possible d'en juger, des activités identiques et le fractionnement qui a conduit à l'obtention des fractions n° 3, n° 4 et n° 5, n'a pas divisé ces substances inconnues en fractions d'activités différentes. Ce fait laisse espérer que lorsqu'en opérant sur une quantité assez grande de matière première, nous aurons pu poursuivre la purification jusqu'à l'élimination complète des phosphoaminolipides et des glucides, les fractions obtenues ne seront plus susceptibles d'être fractionnées encore par l'alcool méthylique.

Étude de quelques propriétés physico-chimiques des fractions actives.

Nous avons déjà dit ci-dessus (page 550) que des substances lipidiques actives étaient enlevées de leur solution éthérée par de l'eau mise en contact avec cette solution éthérée. Ce phénomène assez surprenant nous a semblé digne d'une étude plus précise et nous l'avons entreprise sur une fraction déjà assez purifiée et très active analogue à la fraction G, préparée d'ailleurs par une méthode légèrement différente.

L'activité de cette fraction que nous appellerons G' était au voisinage de 1.000 ; nous en avons prélevé trois échantillons identiques pesant chacun 30 milligrammes, que nous avons séparément dissous dans 10 cent. cubes d'éther ordinaire.

Chacune de ces solutions fut placée dans une boule à décanter en présence de 10 cent. cubes d'eau distillée. Dans l'eau de l'une de ces boules nous avions, au préalable, ajouté deux gouttes d'acide chlorhydrique concentré ; dans la deuxième boule, nous avions au contraire ajouté deux gouttes de lessive de soude, tandis que dans la troisième boule, nous n'avons rien ajouté à l'eau distillée. Les trois boules furent agitées assez énergiquement, puis laissées au repos pendant trois jours. Les trois phases aqueuses limpides furent ensuite séparées des phases étherées par décantation (1) ; l'éther fut lavé encore une fois pendant vingt-quatre heures avec un peu d'eau, puis évaporé.

Après dessiccation à poids constant, les résidus ont été pesés et leurs activités étudiées :

	POIDS de ce qui restait dans l'éther en milligrammes	ACTIVITÉS
Cas de l'eau acidulée	18,0	200
Cas de l'eau distillée	5,6	400
Cas de l'eau alcalinisée	9,5	0 (moins de 10).

Or, la substance qui avait servi à l'essai avait une activité de 1.000 et chaque solution étherée en contenait au début 30 milligrammes. Les phases étherées n'avaient donc, dans tous les cas, gardé qu'une faible partie de l'activité primitive, 12 p. 100 dans le cas de l'eau acidulée et 7,5 p. 100 dans le cas de l'eau distillée pure, tandis que toute activité avait pratiquement disparu de la solution étherée mise en contact avec l'eau alcaline.

Nous avons naturellement mesuré l'activité des substances passées dans les phases aqueuses. Pour cela, nous avons neutralisé avec soin ces solutions ; nous en avons chassé l'éther par un courant d'azote, puis nous les avons isotonisées et diluées de façon que chaque centimètre cube contienne en solution 1 milligramme de substances étudiées.

1) Des émulsions assez persistantes nous ont un peu gênés dans ces opérations, nous avons dû les briser par centrifugation.

Activités des substances passées dans les phases aqueuses.

	POIDS de ces substances	ACTIVITÉS
Cas de l'eau acidulée	12,0	80
Cas de l'eau distillée.	24,4	1.200
Cas de l'eau alcalinisée	20,5	5

CONCLUSIONS DE CES ESSAIS. — L'eau distillée neutre extrait sans les dénaturer la presque totalité des substances actives, et laisse dans l'éther quelques substances inactives et des traces de substances actives.

L'eau distillée acidulée enlève à l'éther assez peu de substances d'ailleurs très peu actives et celles restant dans l'éther perdent une grande partie de leur activité ; l'acide a donc détruit une très forte proportion de l'activité.

L'eau distillée alcalinisée détruit complètement toute activité.

Essais avec des phases aqueuses tamponnées, de pH connus.

L'influence de la réaction du milieu apparaît comme primordiale ; nous avons donc opéré avec plus de précision à ce sujet en utilisant comme phase aqueuse des solutions tampons.

Pour que nos résultats ne soient pas troublés par une influence des ions négatifs des solutions tampons, nous avons préparé trois solutions tampons contenant toutes une même quantité d'ions acétiques et une même quantité de radical phosphorique, à savoir $M/_{15}$ en CH^3COO et $M/_{15}$ en PO^3H^2 , nous avons fait seulement varier la quantité de soude présente dans les trois solutions de façon à amener les pH aux valeurs suivantes :

1° Tampon.	pH = 4,74
2° Tampon.	pH = 6,95
3° Tampon.	pH = 10,68

Nous avons dans cette expérience opéré pour chaque essai sur 100 milligrammes de la fraction G, que nous avons dissous dans 25 cent. cubes d'éther, et mis en contact avec 15 cent. cubes de la solution tampon correspondante. Après

avoir laissé suffisamment longtemps au repos (trois jours), on sépare les deux phases par décantation, puis on lave d'une part les phases éthérées par agitation avec 10 cent. cubes de solution tampon correspondante et d'autre part les phases aqueuses avec 15 cent. cubes d'éther. Les phases éthérées de lavage sont réunies aux phases éthérées correspondantes, tandis que les phases aqueuses de lavage sont réunies aux phases aqueuses correspondantes. Pour chaque pH, nous avons ainsi une solution éthérée que l'on évapore à sec (1), et une phase aqueuse dont on chasse l'éther dissous par barbotage d'azote; les phases aqueuses sont ensuite neutralisées avec soin, puis additionnées des quelques gouttes d'eau nécessaires pour compléter leurs volumes à 25 cent. cubes.

Les phases éthérées contenaient des quantités de substances très variables suivant le pH des solutions tampons avec lesquelles elles avaient été en contact :

pH des phases aqueuses	POIDS DES SUBSTANCES restées dans les phases éthérées qui contenaient à l'origine 100 milligrammes (en milligrammes)	ACTIVITÉS	
		des substances restées dans l'éther	des substances passées dans l'eau
—	—	—	—
4,74	86,6	1.000	1.200
6,95	66,7	800	1.100
10,68	14,2	500	600

Ces résultats nous montrent combien la réaction du milieu intervient sur le phénomène; c'est lorsque la phase aqueuse est alcaline (pH = 10,7) qu'il passe le plus de substances de l'éther dans l'eau, mais cette alcalinité fait perdre une forte proportion de l'activité des substances étudiées. Si le milieu est plus alcalin encore, comme nous l'avons vu dans l'expérience précédente, l'activité est complètement détruite.

C'est lorsque la phase aqueuse est légèrement acide (pH 4,75) que l'activité des substances étudiées reste rigoureusement inchangée, mais dans ces conditions le passage de l'éther dans l'eau est lent. Nous avons déjà vu dans l'expérience précé-

(1) Dans l'éther étaient des traces d'émulsions que nous avons éliminées par centrifugation. Cette centrifugation a rassemblé quelques traces de substances (3 milligrammes pour chaque essai) que nous avons éliminées après avoir constaté qu'elles ne présentaient pas une activité supérieure à celle des autres substances.

dente (voir p. 566) que si le milieu est très acide, une forte proportion de l'activité disparaît.

En milieu neutre (pH 6,95) l'activité est assez bien conservée (très légère perte) et le passage de l'éther dans l'eau se fait bien.

Ces expériences nous montrent combien il faut craindre, dans les recherches sur les haptènes qui nous intéressent, toute action des substances alcalines et tout contact avec une solution nettement acide.

C'est en milieu très légèrement acidulé que l'activité se conserve sans perte.

Ces expériences nous montrent en outre combien il faut craindre le lavage à l'eau des solutions éthérées d'haptènes lipoidiques si l'on désire laisser dans l'éther les substances actives.

Le passage dans l'eau pourrait d'ailleurs servir à séparer l'haptène d'avec les lipides inactifs qui restent dans l'éther; nous avons fait quelques essais dans ce sens, ils ne sont pas encore à leur terme.

Étude des phases aqueuses actives.

Il était très intéressant de savoir à quel état physique se trouvaient dans l'eau les substances lipoidiques actives : solution? émulsion? sol colloïdal? et dans ce cas, quels étaient la stabilité et la dimension des grains. Les solutions aqueuses semblaient limpides, mais présentaient un très léger phénomène de Tyndall.

L'examen ultramicroscopique montrait la présence de grains extrêmement fins dont la plupart étaient à la limite de visibilité.

Les grains semblaient beaucoup plus gros dans le cas de la phase acide que dans les cas des phases neutres ou alcalines. Dans ces derniers cas, une forte proportion des substances était sûrement à l'état d'amicrons invisibles.

L'addition d'une trace d'éther à l'une quelconque des phases aqueuses faisait très notablement diminuer le nombre des grains visibles.

Dialyse. — Aucune trace de substance active n'est capable de traverser par dialyse une membrane de collodion même assez perméable.

Conclusion. — Les substances actives sont dans l'eau à l'état de sol colloïdal extrêmement fin.

Filtration. — Nous avons cherché à savoir si les grains des émulsions étaient retenus par des filtres bactériologiques en terre poreuse assez peu perméable tels que les bougies L3 et nous avons constaté que les solutions aqueuses provenant de la solution tampon à pH 10,7 passaient à travers ces filtres sans perdre une trace de leur activité. La solution provenant de l'expérience à pH 7 passait à travers la bougie L3 en conservant la majeure partie de son activité; mais la quantité de substances actives retenues par la bougie poreuse est cependant loin d'être négligeable (30 à 50 p. 100).

La solution provenant de l'expérience en milieu acide (pH 4,74) perd totalement son activité en passant au travers de la bougie poreuse.

Ce fait confirme ce que nous avons constaté lors de l'examen ultramicroscopique des phases aqueuses; les grains d'émulsion sont beaucoup plus gros dans la phase acide que dans la phase neutre, et c'est dans la phase alcaline qu'ils sont le plus petits.

Un fait curieux est d'ailleurs à noter ici.

La perte d'activité par filtration de la solution aqueuse provenant de l'expérience en milieu acide est absolument complète, rien d'actif ne passe à travers la bougie. L'activité de la solution étudiée passe par exemple de 500 à moins de 0,5; le filtre ne laisse donc pas même passer 1/1.000 des substances actives, tandis que pour la phase provenant de l'expérience à pH 10,7 on ne peut pas déceler une baisse d'activité quelconque par passage à travers la bougie poreuse. Lors de la filtration, cependant, le pH était le même dans les deux cas, car nous avions neutralisé avec grand soin à pH 7 (6,9 à 7,1). La constitution des solutions était d'autre part identique au point de vue des électrolytes puisque ces solutions avaient été ramenées au même pH à partir de solutions dont les ions acides étaient identiques et à concentrations identiques (voir ci-dessus, p. 566). Il semble donc que, seule pouvait varier la dimension des grains colloïdaux (1).

(1) On pourrait aussi penser que l'adsorption sur le filtre dépend de l'orientation dans les grains de certaines molécules présentant à la surface une fonction plus ou moins adsorbable. Lorsque les grains se sont formés

Tous ces faits nous font prévoir que la ou les substances actives sont différemment hydrophiles ou hydratables suivant le pH; il s'agit donc probablement de substances possédant une ou des fonctions polaires telles que des fonctions acides. Ayant ainsi constaté l'hydrophilie si nette des fractions actives, nous avons voulu voir si ces fractions s'imbibaient, se gonflaient ou se dissolvaient dans l'eau.

Pour cela, nous en avons placé des parcelles dans une chambre humide, sous le microscope, et nous avons constaté un gonflement rapide et très intense; il se forme quelques figures myéliniques, puis assez rapidement, tout se fragmente en globules de plus en plus petits. Après quelques heures on a une solution colloïdale fine dans laquelle on n'aperçoit plus que quelques petits globules très peu réfringents qui se dispersent de plus en plus.

Il est intéressant de constater que la fraction γ_2 (phosphatides inactifs) se gonfle aussi dans l'eau d'une façon assez comparable.

La fraction très impure et très active γ_2 se gonfle aussi très abondamment, puis se fragmente en globules irréguliers qui n'évoluent que très lentement et par agitation vers un sol colloïdal d'ailleurs pas très fin.

En rapprochant ces faits d'avec d'autres faits tels que la richesse si grande en phosphore des fractions actives et la très grande insolubilité des fractions actives dans l'acétone, on conçoit très bien que jusqu'ici les divers auteurs qui avaient étudié le pouvoir haptène des extraits lipidiques de bacille tuberculeux avaient rapporté l'activité haptène aux phosphoaminolipides. Nous avons vu qu'il n'en est rien, les lipides

en milieu acide, ils ont peut-être orienté, vers la phase dispersante acide les fonctions électro-négatives de leurs molécules, tandis qu'en se formant en milieu alcalin, ils ont orienté vers l'eau des fonctions de signe inverse. La surface des grains colloïdaux pourrait ainsi varier suivant les conditions de formation des grains.

Ces grains une fois formés, n'ont plus, en l'absence du solvant éther, la possibilité de faire un réarrangement malgré la neutralisation de la phase dispersante. Les fonctions polaires de la surface des grains étant un facteur primordial de l'adsorption, on concevrait alors les différences d'adsorption des grains provenant du milieu acide ou du milieu alcalin, même lorsque le milieu a été neutralisé.

Dans certains essais, nous avons effectué d'ailleurs la filtration de la phase acide avant sa neutralisation et le résultat fut à peu près identique : moins du millième de l'activité passe à travers la bougie poreuse.

actifs ne sont pas des phospho-aminolipides, ils sont privés d'azote et de plus les phospho-aminolipides eux-mêmes sont inactifs.

Conclusions.

Nous avons poussé très avant l'isolement de la fraction lipidique du bacille tuberculeux qui possède la propriété de fixer l'alexine en présence de sérums d'animaux ou d'hommes tuberculeux.

Après avoir cherché la technique d'extraction donnant le meilleur rendement en fraction active brute, nous avons eu en main une masse assez importante de cette fraction et nous avons pu la fractionner par diverses méthodes basées sur des différences de solubilités dans l'alcool méthylique tiède ou refroidi, puis dans des mélanges convenables de chloroforme et d'alcool méthylique refroidi.

Nous avons ainsi pu montrer :

1° Que les phospho-aminolipides du bacille sont inactifs comme haptène; l'activité haptène de fixation appartient à d'autres substances lipidiques différentes des phospho-aminolipides;

2° Que les substances actives sont dépourvues d'azote;

3° Que ces substances actives contenues dans des fractions lipidiques ne sont pas des polysides et même qu'elles ne donnent aucun sucre par hydrolyse;

4° Que les substances lipidiques actives ne sont pas des dérivés d'un stérol ni d'un quelconque insaponifiable éthéro-soluble;

5° Que ces substances si actives comme haptènes de déviation sont complètement inactives comme haptènes de précipitation; leurs sols ne précipitent pas, en effet, en présence des sérums d'animaux tuberculeux;

6° Que ces substances sont des haptènes de fixation dans le sens le plus strict et qu'ils ne sont pas des antigènes complets sans union préalable avec un protéide hétérogène;

7° L'activité haptène de fixation n'appartient pas à divers groupes de substances lipoidiques, mais à un seul groupe très limité de substances ou même peut-être à une seule substance lipoidique;

8° Les fractions actives se gonflent, puis se dispersent facilement lorsqu'on les met en présence d'eau. Les substances lipodiques actives présentent d'ailleurs une si grande affinité pour l'eau que ces substances abandonnent l'éther pour passer dans une phase aqueuse mise en contact avec leur solution éthérée. Ce phénomène de passage d'une phase à l'autre est influencé par divers facteurs et en particulier par la réaction du milieu aqueux;

9° Toutes les fractions actives, même les plus purifiées sont très riches en phosphore (3,4 p. 100); il est donc assez probable que les substances actives sont phosphorées.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. MACHEBEUF, G. LÉVY, N. FETHKE, J. DIERYCK et A. BONNEFOI. Études chimiques sur le bacille tuberculeux, premier mémoire, *Ces Annales*, **52**, 1934, pp. 277 à 307.
- [2] M. MACHEBEUF, G. LÉVY et A. CHAMBAZ. Études sur les antigènes fixateurs des bacilles tuberculeux, premier mémoire, *Ces Annales*, **53**, 1934, pp. 591 à 598.
- [3] M. MACHEBEUF et A. BONNEFOI. Études sur les antigènes fixateurs des bacilles tuberculeux, deuxième mémoire, *Ces Annales*, **55**, 1935, pp. 433 à 440.
- [4] M. MACHEBEUF, J. DIERYCK et R. STROP. Études chimiques sur le bacille tuberculeux, deuxième mémoire, *Ces Annales*, **54**, 1935, pp. 71 à 86.

RECHERCHES SUR LES PHÉNOMÈNES MICROBIOLOGIQUES DES SOLS SAHARIENS

par Ca. KILLIAN (Alger) et D. FEHÉR (Sopron-Hongrie).

(*Travail du Laboratoire de Biologie Saharienne de la Faculté des Sciences d'Alger, à Beni-Ounif, n° 3. Directeur : CH. KILLIAN.*)

L'exploration des phénomènes biologiques dans les sols sahariens présente un intérêt de tout premier ordre. Par suite des conditions climatiques extrêmes, on y trouve réalisé un milieu biologique qui entrave souvent la vie microbienne; parmi les facteurs limitatifs les plus importants sont :

- 1° La teneur hydrique extrêmement basse ;
- 2° Les températures souvent très élevées du sol.

On s'est imaginé pendant longtemps que la plupart des sols désertiques sont complètement stériles; mais l'opinion se fait jour, de plus en plus, suivant laquelle certains représentants de la flore et de la faune du sol se sont adaptés au cours de leur évolution phylogénique aux conditions extrêmes de vie ; effectivement, on se trouve en présence d'êtres organisés même à des endroits qu'on considérerait comme stériles, il y a peu de temps encore.

Notre but était donc d'explorer la vie dans les sols désertiques, au point de vue quantitatif, mais surtout au point de vue qualitatif, et d'en établir les rapports de cause à effet. Nous nous appesantirons principalement sur le côté dynamique de ce sujet.

D'autre part, nos recherches ont été inspirées non seulement par des considérations d'ordre scientifique, mais elles ont, en même temps, visé certaines applications pratiques.

Si l'on veut étendre au Sahara, du moins à ses confins, l'aire des plantes cultivées, il faut, bien entendu, tenir compte du manque d'eau qui constitue le facteur limitatif le plus important; mais en dehors de cela, il s'agit d'y connaître tous les autres facteurs qui, ailleurs, jouent un rôle important

pour la culture des végétaux, tels que : nitrification, dénitrification, dégradation de la cellulose et fixation de l'azote.

Le Laboratoire de Biologie désertique de Beni-Ounif, où nous avons fait nos mesures, est situé dans une région du désert où la pluie tombe chaque année, quoique en petite quantité. Une occasion favorable se présentait par conséquent d'y étudier la vie du sol, comparativement, après les pluies et en période sèche et d'y préciser ainsi l'influence du facteur température et du facteur humidité du sol.

Des recherches quantitatives de ce genre exigent un outillage de laboratoire coûteux et complexe dont ne pouvait disposer une création aussi récente que celle de Beni-Ounif ; c'est pour cette raison et surtout pour utiliser au mieux le temps et les possibilités de travail dont nous disposions que nous nous sommes limités aux mesures qui devaient être faites sur place et au plus vite possible, après le prélèvement. Tout le reste a été déterminé dans les laboratoires métropolitains des deux auteurs.

Quant à la technique utilisée, nous renvoyons le lecteur à la littérature, citée dans la liste bibliographique.

Sujets d'investigation.

I. — *Caractères physiques du sol :*

- 1° Capacité en air ;
- 2° Capacité en eau ;
- 3° Teneur en air ;
- 4° Teneur en eau ;
- 5° Particules solides ;
- 6° Température ;
- 7° Acidité potentielle (électrode à chinhydrone) ;
- 8° Conductivité.

II. — *Caractères chimiques :*

- 9° Teneur en humus (par la combustion à l'acide chromique) ;
- 10° Teneur en nitrates (méthode de Whilnj, Richmond et Schoonover),
- 11° Az total, suivant Kjeldahl ;
- 12° P total et soluble en acide citrique ;
- 13° K total et soluble en acide citrique ;
- 14° Teneur en CaCO_3 .

III. — *Caractères biologiques :*

- 15° Teneur en bactéries aérobies et anaérobies ;
- 16° Teneur en champignons ;

- 17° Teneur en algues ;
 18° Les principaux groupes physiologiques de bactéries tels que nitrificateurs, dénitrificateurs, fixateurs d'Az (aérobies et anaérobies), cellulolytiques (aérobies et anaérobies), uréolytiques, butyriques ;
 19° La respiration du sol en plein air et au laboratoire.

Description des surfaces d'expérience (fig. 1).

Dans ce qui suit, nous caractérisons nos surfaces d'expérience par la flore qu'elles supportent.

Surface d'expérience I : Dune locale (erg) dans une palmeraie à 4 kilomètres à l'ouest de Beni-Ounif ; végétation : *Telephium sphaerospermum*, *Helianthemum Lippii*, *Aristida pungens*, *Anvillea radiata*, *Anabasis aretioides*, *Zizyphus lotus*, *Salvia ægyptiaca* (fig. 2).

Surface d'expérience II : Reg (désert caillouteux) à 3,5 à 5 kilomètres à l'ouest de Beni-Ounif à la limite du territoire de Figuig ; végétation constituée de *Convolvulus supinus*, *Launea nudicaulis*, *Launea arborescens* (fig. 3).

Surface d'expérience III : Argile (3 kilomètres à l'ouest de Beni-Ounif), sans végétation ; dans des dépressions limoneuses des environs, nous avons relevé les espèces buissonnantes suivantes : *Thymelaea microphylla*, *Zilla spinosa*, *Launea arborescens*, *Linaria sagittata*, *Ononis glabrescens* ; espèces herbacées : *Echinops Bovei* var *pallidus*, *Limonium Guyonianum*, *Peganum harmala*, *Noletia chrysocomoides*, *Fagonia longispina*, *Aluoropus repens*, *Pennisetum dichotomum* (fig. 4).

Surface d'expérience IV : Sol argileux, non cultivé, d'une palmeraie près de Beni-Ounif avec : *Phoenix dactylifera*, près d'une seguia ; au voisinage se trouvait la végétation spontanée suivante : *Arundo donax*, dune locale supportant : *Lygeum spartium*, *Randonia africana*, *Thymelaea microphylla*, *Nitraria Schoberi*, *Zygophyllum album*, *Ifloga spicata*, *Aristida obtusa*, *Aristida pungens* (fig. 5).

Surface V : Oasis près du village de Beni-Ounif, sol argileux avec culture d'orge ; après la moisson, en avril, s'y installent comme plantes rudérales : *Convolvulus arvensis* et *Launea nudicaulis* (fig. 5).

Surface d'expérience VI : Sol argilo-sablonneux d'une palmeraie dépérissante, près de Beni-Ounif (fig. 6 et 7).

Au-dessous des palmiers on trouve une végétation rudérale de *Peganum harmala* et sauvage de *Haloxylon tamaricifolium*.



FIG. 2. — Surface d'expérience I.



FIG. 3. — Surface d'expérience II.

Surface d'expérience VII : 25 kilomètres au sud-ouest de Beni-Ounif ; argile complètement dépourvue de végétation.

Surface d'expérience VIII : Oasis de Fendi, sol argileux non



FIG. 4. — Surface d'expérience III.



FIG. 5. — Surface d'expérience V.

cultivé; la végétation autochtone y est représentée par *Nerium oleander* et *Vitex agnus castis* (fig. 8).

Surface d'expérience IX : VIII à 1^m6 de profondeur.

Surface d'expérience X : Sol argileux cultivé de l'oasis de Fendi, ensemencé d'orge.

Surface d'expérience XI : Reg, à 28 kilomètres au sud-ouest de Beni-Ounif; espèces dominantes : *Zizyphus lotus* et *Anabasis*



FIG. 6. — Surface d'expérience VI.

aretioïdes. L'échantillon y fut prélevé près d'un pied puissant de *Pistacia atlantica* (fig. 9).

Surface d'expérience XII : Sol argileux de l'ancienne palmeraie de Fendi.

Surface d'expérience XIII : Sol sablonneux au bord d'un oued, à 20 kilomètres au sud de Beni-Ounif; espèce dominante : *Rætama rætam*.

Surface d'expérience XIV : Sol argileux très compact et sans végétation de l'oasis de Figuig.

Surface d'expérience XV : Sable mouvant des dunes de

l'oued Zousfana, sans végétation herbacée; quelques palmiers seulement (fig. 10).

Surface XVI: Ilot argileux, sans végétation, près du précédent.

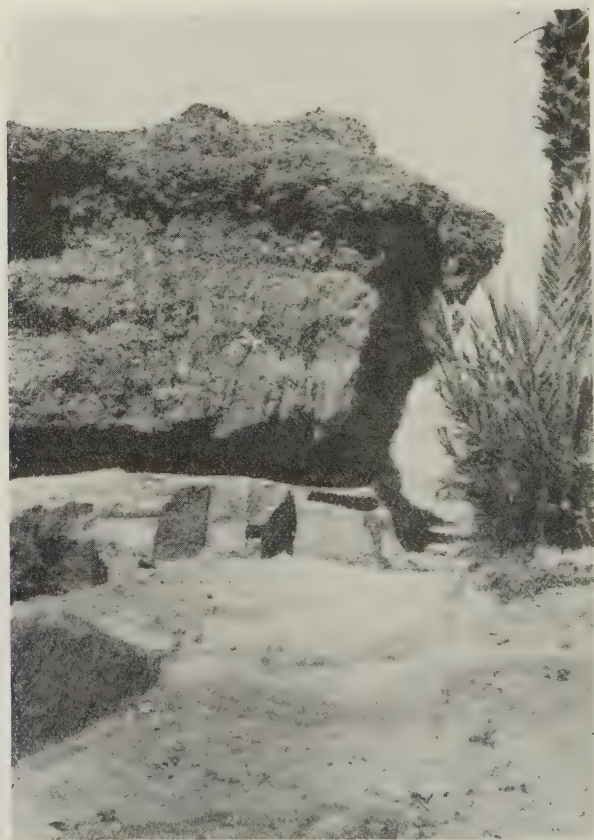


FIG. 7. — Profil typique du sol désertique et de son substratum gréseux au voisinage de la surface d'expérience VI.

Surface XVII : Reg, près Beni-Ounif.

Principales espèces : *Anabasis aretioides*, *Fagonia glutinosa*, *Zizyphus lotus*, *Linaria sagittata*, *Farsetia linearis*, *Bassia muricata*, *Launea arborescens*, *Aristida obtusa*, *Gymnocarpus decander* (fig. 11).

Résultats de nos mesures.

Dans les trois chapitres qui vont suivre, nous exposerons les résultats de nos mesures. La première partie sera consacrée à



FIG. 8. — Surface d'expérience VIII.

l'étude des conditions de vie de la microflore désertique, en réservant une attention spéciale aux facteurs eau et température du sol; nos observations faites au dehors seront complétées par celles que nous avons faites au laboratoire,

Dans la deuxième partie, nous décrirons la composition quantitative de la microflore des sols.

La troisième partie enfin sera consacrée aux résultats des analyses chimiques et physiques.

I. — ETUDES DES PHÉNOMÈNES BIOLOGIQUES FONDAMENTAUX
DU SOL DÉSERTIQUE
ET DE LEUR RAPPORT AVEC SA TEMPÉRATURE ET SA TENEUR HYDRIQUE.

En ce qui concerne la teneur hydrique du sol et son influence sur la vie microbienne, on n'en connaît ni la limite supérieure,



FIG. 9. — Surface d'expérience XI.

ni la limite inférieure. Mais il est certain que non seulement les bactéries du sol mais aussi les champignons et les algues terrestres s'adaptent parfaitement aux conditions extrêmes. C'est là le point le plus important de nos résultats.

Pour pouvoir mettre en évidence l'effet de la teneur hydrique, très variable suivant les saisons, nous avons répété nos mesures aux différentes époques de l'année. Les pluies, lorsqu'elles tombent en hiver, au printemps ou en automne, étant rares et ne dépassant pas 60 à 80 millimètres dans leur ensemble, la



FIG. 10. — Surface d'expérience XV.



FIG. 11. — Surface d'expérience XVII.

teneur hydrique du sol sera, vers l'été, rapidement réduite au minimum.

Le minimum d'eau étant généralement dépassé en saison relativement humide, il en résulte que des changements même insignifiants peuvent alors y déclencher des fluctuations importantes du nombre des micro-organismes.

La figure 12 et le tableau I montrent ainsi quel est le rap-

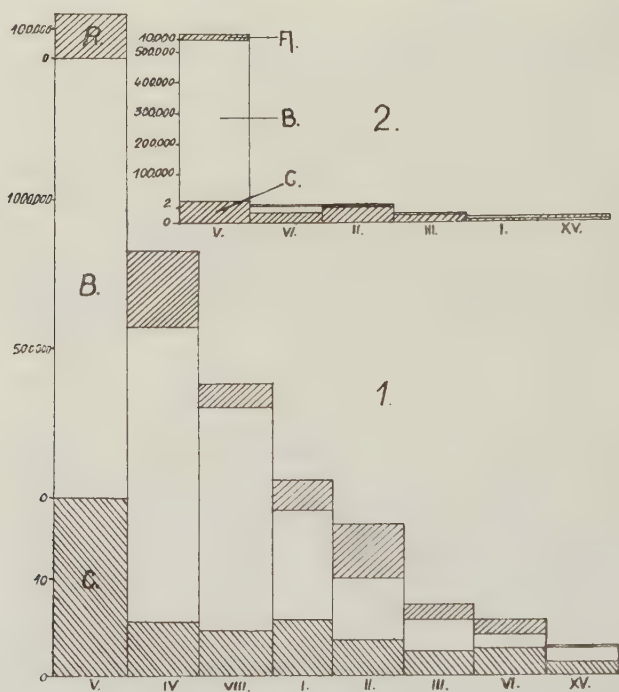


FIG. 12. — Les fluctuations saisonnières de la teneur en Champignons et en Bactéries.

1, printemps; 2, été; A, Champignons; B Bactéries; C, teneur en eau: g. de sol humide.

port entre le nombre des bactéries et des champignons et la teneur hydrique du sol. Ce rapport est d'ailleurs moins net pour le sol V (terre fertile d'oasis), très différent des sols désertiques naturels, non modifiés par l'homme.

Si nous faisons abstraction de ce milieu particulier, le fait suivant ressort de notre graphique, avec netteté: lorsque la

TABLEAU I. — Résultats de l'analyse microbiologique. Les micro-organismes par gramme de terre humide.

NOMBRE de la surface d'expérience	Époque	BACTÉRIES			CHAMPIGNONS	NITRIFIQUEURS	DÉNITRIFICATEURS	FIXATEURS d'Az.		CELLULOLYTIQUES		URÉOLYTIQUES	RESPIRATION du sol		TENEUR EN EAU p. 100
		Aérobies	Anaérobies	Somme				Aérobies	Anaérobies	Aérobies	Anaérobies		Plein air g. : m ³ /h.	Laboratoire g. : h./cm ²	
I	Avril.	88 600	1 000	89 600	97 300	400	40 000	100	1 000	100	100	0	0,045	0,275	5,0
	Juin.	7 000	1 000	8 000	2 000	400	4 000	40	400	40	0				0,2
II	Avril.	202 000	1 000	203 000	189 000	400	40 000	40	0	100	0	40 000	0,072	0,459	3,5
	Juin.	4 000	1 000	5 000	3 000	10	4 000	40	0	40	0				1,5
III	Avril.	405 000	1 000	406 000	48 600	400	4 000	40	1 000	40	0	40 000	0,0002	0,427	2,3
	Juin.	4 000	2 000	3 000	4 000	40	400	40	10	10	0				0,6
IV	Avril.	953 000	46 000	999 000	264 000	400	10 000						0,035	0,513	5,4
	Avril	1 413 000	46 600	1 459 000	148 000	4 000	100 000	400	1 000	4 000	1 000	100 000	0,10	0,791	48,2
V	Juin.	500 000	40 000	540 000	15 600	500	40 000	400	400	4 000	0				2,2
	Avril.	49 000	0	49 000	50 000	400	40 000	100	0	100	0	10 000			2,6
VI	Juin.	20 000	5 000	25 000	5 000	40	4 000	40	0	40	0	40 000			0,98
	Avril.	687 000		687 000	70 000										4,5
XV	Avril.	43 000	8 300	51 300	2 000	400	4 000	40	400	40	400	0	0,04	0,44	1,9
	Juin.	1 000	1 000	2 000	2 000	40	400	40	0	40	0	0			0,4

teneur en eau diminue au-dessous de 1 p. 100, le nombre des bactéries diminue aussi, très rapidement. Les conditions de vie semblent alors effectivement s'approcher de leur limite inférieure. Mais la vie n'est pas éteinte, car il y a toujours des micro-organismes qui sont à même de s'adapter à ces conditions extrêmes.

A côté de la teneur en eau, la concentration de l'humus joue, bien entendu, un rôle important.

Précisément le nombre microbien élevé de l'oasis peut être expliqué entre autres par le taux relativement élevé d'humus qui caractérise ce sol.

La figure 13, complétant la précédente, illustre par un autre principe graphique, le rapport entre teneur en eau et teneur en micro-organismes. Ce fait est récapitulé par le tableau II où nous avons résumé les chiffres microbiens, les plus bas et leur rapport avec les teneurs hydriques correspondantes.

TABLEAU II. — Nombre des bactéries et des champignons par rapport au taux hydrique du sol.

NUMÉRO	TENEUR EN EAU p. 100	NOMBRE des bactéries par gramme de terre humide	NOMBRE des champignons par gramme de terre humide
1	0,2	8.000	2.000
2	0,4	2.000	2.000
3	0,6	3.000	1.000
4	0,98	25.000	5.000
5	1,5	5.000	3.000
6	1,9	51.300	2.000
7	2,2	540.000	15.000
8	2,3	106.000	48.600
9	2,6	49.000	50.000
10	3,5	203.000	189.000
11	4,5	687.000	70.000
12	5,4	999.000	261.000
13	5,6	89.600	97.300
14	18,2	1.459.000	148.000

Mais, un autre fait ressort en même temps des chiffres ci-dessus : dans ce rapport les chiffres relatifs aux bactéries diminuent bien plus rapidement que ceux relatifs aux champignons.

La conclusion s'impose donc que les champignons du sol sont mieux adaptés aux conditions de sécheresse extrême que

les bactéries ; on pourrait attribuer cette particularité à leur faculté de produire rapidement des spores.

S'il y a donc encore de la vie dans ces sols, extrêmement secs, on pourrait admettre qu'elle n'existe que sous une forme inactive, à l'état enkysté.

En effet, toutes les espèces qui ne sont pas capables de s'en-

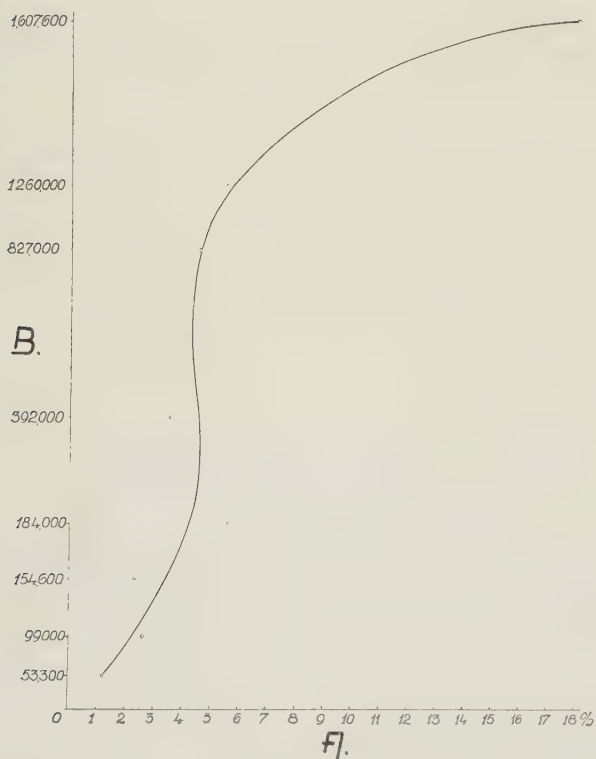


FIG. 13. — Le rapport entre le nombre des microbes et la teneur en eau en avril.

A, teneur en eau en pour cent du poids; B, nombre de micro-organismes (Bactéries et Champignons).

kyster, telles que les bactéries asporogènes, diminuent rapidement en saison sèche. D'autre part, les espèces anaérobies, capables de sporuler, augmentent rapidement leurs nombres avec la diminution de la teneur en eau.

Pour pouvoir nous rendre compte du côté dynamique de la

vie microbienne nous avons mesuré, avec succès, la *respiration du sol*. Le dégagement de CO_2 dépend, en effet, directement de l'activité microbienne. Il résulte des phénomènes de décomposition de la matière organique, provoquée par les bactéries et les champignons. Par conséquent, l'intensité de la respiration du sol est un critérium précis pour démontrer la présence d'espèces actives de ces micro-organismes.

Nous avons utilisé dans ce but des appareils gazométriques de Lundegårdh. Quelles que soient les critiques adressées à



FIG. 14. — Le rapport entre le nombre de Bactéries, la capacité en air, la teneur en eau et la respiration du sol.

N° 1, mesures au laboratoire; n° 2, mesures en plein air; A, teneur en microbes \times teneur en eau \times capacité en air; B, respiration du sol pour n° 1 : g/kg./m³ et h. pour n° 2 : g/m³ et h.

leur sujet, ils se sont révélés comme étant extrêmement appropriés aux conditions souvent pénibles du travail en plein air de l'écologiste.

Les résultats que nous avons obtenus, pour ce qui concerne la respiration du sol, sont résumés par la figure 14.

Nous avons pu constater que malgré leur humidité extrêmement basse tous les types de sols, autrefois considérés comme stériles, renferment des micro-organismes à l'état de vie active.

Afin de pouvoir établir une comparaison, à ce point de vue, entre les différents sols, très distincts par leurs caractères physiques, nous avons tenu compte de ces caractères en utilisant pour nos calculs les données établies par nos mesures. Dans ce but nous avons multiplié, comme dans nos travaux précédents, le nombre des bactéries par les chiffres relatifs à la teneur en eau et à la capacité en air et établi le quotient avec la respiration du sol.

Nous avons trouvé, de cette façon, des rapports nets entre la respiration du sol, d'une part, et sa teneur en micro-organismes et les caractères physiques du sol de l'autre.

Nos mesures de la respiration du sol en plein air ont été complétées par des mesures correspondantes au laboratoire.

Nous avons utilisé, pour ces dosages, la méthode souvent décrite et très répandue qui consiste à aspirer à travers le sol un courant d'air préalablement décarbonisé. Le CO^2 formé est absorbé par la chaux sodée et dosé gravimétriquement; ces chiffres sont calculés ensuite par Kg de sol frais et par heure.

Grâce à cette méthode on tient compte non seulement de la surface du sol, mais aussi de son poids, facteur négligé par les mesures en plein air.

On peut s'attendre à priori que ces mesures aboutissent à des chiffres plus élevés que les mesures *in situ*.

Tout d'abord la structure du sol subit des changements importants par le prélèvement même. En outre, il faut tenir compte du fait qu'on entraîne, lors du dosage, toute la quantité de CO^2 renfermée primitivement dans le sol.

Malgré tout les taux de CO^2 , ainsi calculés, tout en étant plus élevés, se maintiennent proportionnels à ceux trouvés *in situ*.

Toutes ces mesures, faites en plein air et celles faites simultanément au laboratoire, convergent vers un seul résultat : *Les sols désertiques, considérés autrefois comme stériles, renferment des micro-organismes à l'état de vie active.*

Les résultats de nos investigations ont été groupés rationnellement dans la figure 15; elle confirme absolument nos conclusions précédentes. Tout comme dans nos mesures en plein air nous y avons tenu compte des caractères physiques du sol, tels que la teneur en eau, etc.

Un fait frappe l'attention au premier chef :

Dans notre graphique le sol d'oasis (V) se distingue par ses caractères de tous les autres sols. Ce fait prouve indiscutablement l'influence fondamentale de la culture et de l'irrigation sur l'activité microbienne des sols désertiques.

Parmi tous les facteurs l'eau joue un rôle particulièrement important. L'un de nous (F.), dans ses recherches antérieures, y a

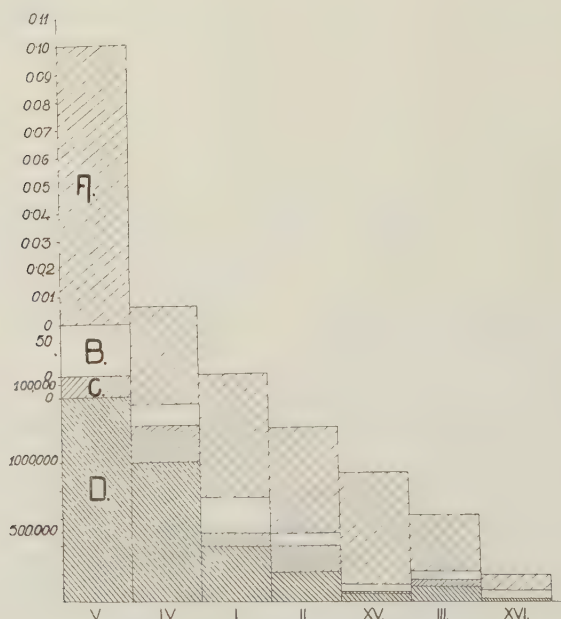


FIG. 15. — Le rapport entre la teneur microbienne, la capacité en air, la teneur en eau et la respiration du sol.

A, respiration du sol en g. : m²/h.; B, teneur en eau en pour cent du poids et capacité en air; C, Champignons du sol; D, Bactéries du sol. En abscisse : numéros des sols.

insisté, en même temps que sur le rôle de la température du sol.

On peut tenir compte de l'action simultanée de ces deux facteurs en utilisant leur produit (R). Or, le facteur température pouvant être considéré comme constant pendant la période où nous avons pu faire nos mesures, nous l'avons négligé pour ne tenir compte que du facteur humidité.

Le rapport entre ce produit R et la teneur microbienne du

sol a pu être formulé mathématiquement par l'un de nous (F.) dans une de ses publications antérieures et il a pu être figuré par une parabole de troisième ordre. Mais cette parabole s'applique exclusivement à des sols renfermant plus de 5 p. 100 d'eau. Il a constaté, à cette occasion, le fait qu'en dessous de ce taux le facteur eau devient limitant. On peut donc s'attendre à ce que, à partir du minimum absolu, donc de 0, l'augmentation de la teneur hydrique entraînera une hausse brusque du nombre des microbes et parallèlement de leur activité biolo-

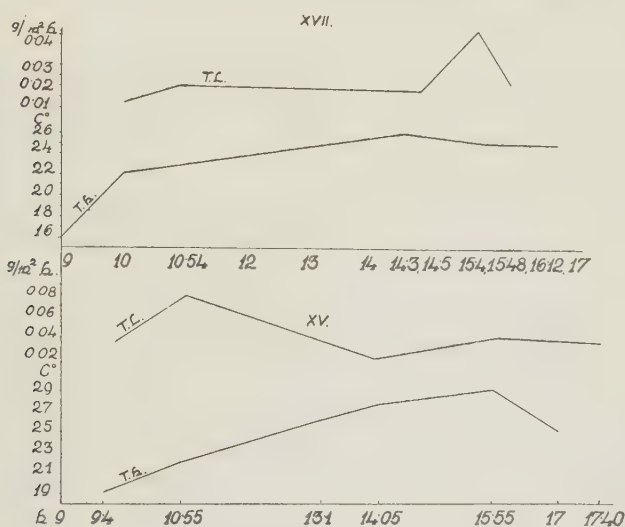


FIG. 16. — La marche journalière de la respiration du sol des stations XV (dune) et XVII (reg).

TC, respiration du sol en g. : m²/h.; Th, température du sol.

gique. Nos observations sont malheureusement jusqu'ici trop peu nombreuses pour que nous puissions suivre la partie de la parabole située en-dessous de ce point critique. Tout ce que nous pouvons affirmer avec certitude c'est que l'allure parabolique de la courbe se maintient, malgré tout.

En résumé, tous les arguments ci-dessus fournissent une preuve de plus que dans des sols ne contenant que 4,5 p. 100 d'eau et considérés autrefois comme complètement stériles, il se manifeste encore de la vie microbienne active.

A nos observations relatives à l'intensité respiratoire des

différentes catégories de sols nous en ajoutons d'autres concernant ces fluctuations journalières. Nos mesures ont été effectuées sur les surfaces XV, XVII (dune de l'oued Zousfana (fig. 10); et reg (fig. 4); celles relatives aux dunes sont particulièrement concluantes (fig. 16).

Il est un fait bien connu que l'optimum thermique de la vie des microbes du sol est en général situé à 25° C. A cela correspond le fait qu'aux heures matinales où la température est au-dessous de 25° la respiration du sol suit une marche ascendante; l'intensité augmente rapidement avec l'augmentation de la température du sol.

Mais dès le moment où celle-là dépasse l'optimum, nous assistons à une baisse de l'intensité respiratoire qui remonte seulement dans les premières heures de l'après-midi pour diminuer dans la suite (fig. 16).

Nous ajouterons aux observations qui précèdent que, pour déterminer le nombre des bactéries, nous avons utilisé non seulement la méthode des cultures mais aussi une autre méthode physique qui consiste à déterminer les changements de p_H d'un milieu de culture (sol stérilisé),ensemencé avec des dilutions croissantes de suspensions microbiennes. Grâce à cette méthode décrite par l'un de nous (F), nous avons trouvé des chiffres bien plus élevés que ceux que donne l'ancienne méthode des cultures gélosées. Ce fait ne nous a d'ailleurs pas surpris et il s'explique aisément puisque, d'après la nouvelle méthode, on cultive les espèces microbiennes sur sols, donc dans un milieu bien plus conforme à leurs particularités; au contraire, les géloses, utilisées par l'ancienne méthode, ne conviennent pas à certaines espèces bactériennes; la numération, par conséquent, y donnera des chiffres plus bas.

Or, nous avons dû maintenir, malgré tout, l'ancienne méthode afin d'en pouvoir comparer les résultats avec les renseignements plus anciens, obtenus exclusivement sur milieux gélosés.

Le tableau III résume les chiffres acquis par l'une et l'autre des méthodes. On remarque que les sols se classent toujours dans le même ordre par rapport à leur richesse microbienne. Ce résultat confirme entièrement la validité de la nouvelle méthode potentiométrique.

TABLEAU III. — Nombre microbien : gramme de terre humide, suivant la méthode potentiométrique et la méthode des cultures gélosées.

NUMÉRO de la surface d'expérience	NOMBRE DES BACTÉRIES		RAPPORT des deux méthodes
	Méthode des cultures gélosées	Méthode potentiométrique	
I.	87.600	1.000.000	1 : 11
II.	203.000	1.670.000	1 : 8
IV.	999.000	3.300.000	1 : 3
V.	1.459.600	5.000.000	1 : 3
VI.	49.000	1.110.000	1 : 23

*Recherches expérimentales sur l'action
des températures supraoptimales sur la vie microbienne.*

Parmi les premiers auteurs qui se sont occupés de la flore bactérienne des sols d'Algérie, il faut citer Nègre ; il s'intéresse plus spécialement aux espèces thermophiles et détermine, en outre, les bactéries trouvées dans la nappe phréatique ; son travail renferme un nombre important de diagnoses relatives surtout aux microorganismes thermophiles, bacilles, bactéries, microcoques, staphylocoques et sarcines ; il nous donne, ensuite, des chiffres intéressants relatifs aux nombres totaux et au rapport entre espèces aérobies et espèces anaérobies.

Mais ce qui donne une valeur particulière à son travail ce sont les recherches expérimentales pour déterminer l'optimum thermique de ces espèces thermophiles du désert ; il en résulte que cet optimum est situé entre 40° et 60°. Ces chiffres correspondent d'ailleurs tout à fait à ceux trouvés par l'un de nous [F.] (1).

Nous mentionnons, de même, ses résultats, particulièrement importants, relatifs à la résistance des espèces désertiques au sel marin.

Somme toute, malgré que Nègre n'ait pas insisté suffisamment sur les diagnoses des bactéries isolées par lui, ses recherches sont fondamentales pour fournir une première orientation dans le domaine de la microbiologie des terres sahariennes.

Nous avons, de même, attaché une attention toute particu-

(1) FEHÉR, Experimentelle Untersuchungen über den Einfluss von Temperatur und Wassergehalt des Bodens auf die Lebenserscheinungen der Bodenbakterien. *Archiv für Mikrobiologie*, 4, 1933, p. 447-487.

lière au problème des manifestations vitales du sol aux températures élevées, réalisées en été. Dans ce but, nous nous baserons d'abord sur les observations estivales faites à une température aérienne d'environ 40°. La température du sol étant, dans ces conditions, souvent supérieure à celle de l'air, nous avons reconstruit au laboratoire les conditions du dehors, en exposant nos sols à des températures plus élevées que 40°.

Nos sols ont donc été exposés, peu de temps après le prélèvement, à la température d'une étuve, comprise entre 50° et 60° et maintenue ainsi pendant trois jours. Le tableau IV nous renseigne sur les résultats de cette expérience. L'élévation de la température entraîne, bien entendu, une diminution correspondante de la teneur en bactéries ; mais la vie microbienne n'y est pas suspendue, quoique la plupart des espèces doivent y abandonner leur vie active et, par l'enkystement, éviter l'action de ces températures nocives.

TABLEAU IV. — Résultats de l'exposition des échantillons de sol à des températures supra-optimales. Nombre des bactéries : gramme de terre humide.

NUMÉRO de la surface d'expérience	AU DÉPART	APRÈS EXPOSITION à 55° C
I	88.600	27.750
II	202.000	4.500
III	103.000	15.500
V	1.413.000	200.000
VI	49.000	5 000
XV	43.000	3.500

Dans ce qui suit, nous allons énumérer les espèces de champignons et de bactéries qui ont résisté à l'action d'une température élevée, située entre 50° et 60°. Les espèces sporigènes figurent, sur cette liste, accompagnées des lettres sp.

Bactéries : *Streptococcus luteus*, *S. terricola*, *Micrococcus candicans*, *Flavobacterium antenniformis*, *Fl. aurescens*, *Chromobacterium lividum*, *Pseudomonas centrifugans*, *Ps. striata*, *Cellulomonas bibula*, *C. cellasea*, *C. minuscula*, *C. rossica*, *C. subereta*, *Achromobacter candicans*, *A. formosum*, *A. Hartlebii*, *Bacillus albolactis* sp., *Bac. candicans* sp., *Bac. cereus* sp., *Bac. cylindricus* sp., *Bac. closterioides* sp., *Bac. graveolens* sp.,

Bac. megatherium sp., *Bac. mycoides* sp.; *Clostridium alhum liquefaciens*, *Cl. alboluteum* sp., *Cl. centrosporogenes* sp., *Cl. hyalinum* sp., *Cl. multifermentans* sp., *Actinomyces cellulosaë* sp., *A. nigricans* sp.

Champignons : *Mucor brevipes*, *M. mucedo*, *M. spinosus*, *Rhizopus nigricans*, *Trichoderma lignorum*, *T. Koningii*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Penicillium crustaceum*, *Sporotrichum laxum*, *S. luteo-album*, *S. polysporum*, *Trichosporium fuscum*.

Il en résulte que dans les sols désertiques ce sont précisément les bactéries sporigènes qui résistent le mieux aux températures élevées. Mais comme les espèces asporigènes n'y ont pas disparu et que, dans la nature même, elles se réveillent chaque printemps, il faut admettre qu'elles se maintiennent, malgré tout, par quelques rares individus à l'état de repos, et que ces individus, extrêmement résistants, supportent les températures élevées et se multiplient activement dès le retour de conditions plus favorables. Nous ferons remarquer que, précisément, les espèces, intéressantes par leurs caractères physiologiques tels que nitrificateurs, dénitrificateurs, fixateurs d'azote et cellulolytiques, se rangent dans cette catégorie.

Le tableau I montre, de même, que le nombre des bactéries appartenant à ces groupes subit une très forte diminution en été; elle peut aller à un tel point qu'il n'est plus possible de démontrer leur existence dans les dilutions dont on se sert couramment pour sols européens. Mais il est un fait remarquable que les espèces dénitrifiantes et cellulolytiques qui ferment d'ailleurs un nombre particulièrement élevé d'espèces sporigènes se maintiennent régulièrement pendant la période estivale.

II. — LA COMPOSITION SPÉCIFIQUE DE LA MICROFLORE DES SOLS DÉSERTIQUES ÉTUDIÉS.

Dans ce qui suit, nous traiterons exclusivement des champignons et des bactéries du sol, réservant un chapitre spécial aux algues. Nous énumérerons dans les tableaux V et VI les espèces que nous avons réussi à isoler à l'état pur dans nos sols d'expérience.

Pour pouvoir se rendre compte de la fréquence de toutes les

TABLEAU V. — Espèces de bactéries isolées des sols désertiques.

NUMÉROS	ESPÈCES BACTÉRIENNES (1)	FACTEUR de répartition (2)	TENEUR EN EAU p. 100	NUMÉRO DE LA SURFACE D'EXPÉRIENCE	ÉPOQUE IV = avril VI = juin	RÉPARTITION par latitude (3) en degrés
PREMIÈRE CLASSE : Schizomycètes.						
I. — Ordre : Eubacteriales.						
1 ^o Famille : Coccaceæ.						
1	<i>Streptococcus aurantiacus</i> n. sp.	40	0,2	I	VI	32
2	<i>Streptococcus luteus</i> n. sp. *	20	0,2	I	VI	32
3	<i>Streptococcus terricola</i> n. sp. *	200	0,2-2,2	I, V, VI	VI	32
4	<i>Micrococcus aurantiacus</i>	60	2,3	III	IV	
5	<i>Micrococcus candidus</i> *	240	0,2-2,2	I, V, VI	VI	32-69,30
2 ^o Famille : Bacteriaceæ.						
6	<i>Serratia macrescens</i>	40	0,2-18,2	I, V	IV, VI	32
7	<i>Flavobacterium antenii formis</i> *	40	0,2-2,6	I, VI	IV, VI	32-47,47
8	<i>Flavobacterium aurescens</i> *	90	0,2-8,9	I, VI, IX	IV, VI	32-66,50
9	<i>Flavobacterium diffusum</i>	150	2,3-5,6	I, III, VII	IV	32-46,15
10	<i>Flavobacterium lacunatum</i>	250	5,4	IV	IV	32-69,30
11	<i>Flavobacterium radiatum</i>	20	2,2	V	VI	32
12	<i>Flavobacterium sulfureum</i>	20	2,2	V	VI	32-46,15
13	<i>Chromobacterium lividum</i> *	50	0,4	XV	VI	32
14	<i>Pseudomonas centrifugans</i> *	50	0,4	XV	VI	32-57
15	<i>Pseudomonas rugosa</i>	80	0,98	VI, VII	IV, VI	32-57
16	<i>Pseudomonas striata</i> *	40	2,6	VI	IV	32-69,30
17	<i>Cellulomonas albidia</i>	150	0,2-2,6	I, V, VI, XV	IV, VI	32-69,30
18	<i>Cellulomonas aureogenes</i>	80	18,2	V, VII	IV	32-46,15
19	<i>Cellulomonas bizozlea</i>	450	5,6-8,9	I, VII, IX	IV	32-57
20	<i>Cellulomonas bibula</i> *	240	0,4-8,9	III, VII, IX, XV	IV, VI	32-69,30
21	<i>Cellulomonas cellulosa</i> *	560	0,2-8,9	I, IV, V, VI, VIII, IX, XV	IV, VI	32-69,30
22	<i>Cellulomonas qitida</i>	30	5,6	I	IV	32-69,30

29	<i>Achromobacter candelians</i> *	900	0,98-8,9	I, IV, VI, VIII, IX	IV, VI	32-32,40
30	<i>Achromobacter centropunctatum</i> *	50		VII	IV	32-46,30
31	<i>Achromobacter delicatulum</i> *	240	0,2-18,2	I, V, VI, VIII	IV, VI	32-66,50
32	<i>Achromobacter fairmountense</i> *	60	2,6	VI	IV	32-47,47
33	<i>Achromobacter formosum</i> *	160	0,6-2,6	III, VI	IV, VI	32-66,50
34	<i>Achromobacter geniculatum</i> *	30	18,2	V	IV	32-51
35	<i>Achromobacter Hartlebii</i> *	420	0,98-4,5	V, VI, VIII	IV, VI	32-57
36	<i>Achromobacter Healii</i> *	60	4,5-18,2	V, VIII	IV	32
37	<i>Achromobacter hyalinum</i> *	150	2 3-8,9	III, VII, VIII, IX	IV	32 66,50
38	<i>Achromobacter liquidum</i> *	50	8,9	IX	IV	32 57
39	<i>Achromobacter multistriatum</i> *	400	18,2	V	IV	32 46,15
40	<i>Achromobacter nebulosum</i> *	20	2,6	VI	IV	32
41	<i>Achromobacter nitrificans</i> *	40	0,2-2,6	I, VI	IV, VI	32 57
42	<i>Achromobacter penatum</i> *	30	18,2	V	IV	32 57
43	<i>Achromobacter sensum</i> *	50	8,9	IX	IV	32 57
44	<i>Achromobacter solitarii</i> *	50	0,4	XV	VI	32
45	<i>Proteus vulgaris</i> *	750	2,3-5,6	I, III, VI, VII, VIII	IV	32

3° Famille : *Bacillaceae*.

46	<i>Bacillus ac-asperus</i> *	30	18,2	V	IV	32
47	<i>Bacillus albolactis</i> *	420	0,4-18,2	I, V, XV	IV, VI	32-69,30
48	<i>Bacillus calidus</i> *	30	18,2	V	IV	32-57
49	<i>Bacillus candicans</i> *	20	0,2	I	VI	32-47
50	<i>Bacillus cereus</i> *	1 300	0,2-18,2	I	IV, VI	32-57
51	<i>Bacillus cylindricus</i> *	40	0,2-18,2	I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, XV	IV, VI	32-57
52	<i>Bacillus circulans</i> *	20	2,2	I, V	IV, VI	32-69,30
53	<i>Bacillus closteroides</i> *	320	0,4-2,2	V	VI	32-57
54	<i>Bacillus cytaseus</i> *	50	5,6	III, V, VI, XV	VI	32
55	<i>Bacillus Freudenbergii</i> *	20	0,2	I	IV	32 57
56	<i>Bacillus fusiformis</i> *	30	18,2	I	VI	32 57
57	<i>Bacillus graveolens</i> *	60	0,2-18,2	I, V, VI	IV	32 57
58	<i>Bacillus megatherium</i> *	200	0,2-18,2	I, V, VII, IX	IV, VI	32-47,47
59	<i>Bacillus mycoides</i> *	50	1,5	II	VI	32-57
60	<i>Bacillus petasites</i> *	50	0,4	XV	VI	32-57
61	<i>Bacillus robustus</i> *	80	0,9-18,2	V, IX	IV	32-57
62	<i>Bacillus sphaericus</i> *	20	2,6	VI	IV	32-57
63	<i>Bacillus subtilis</i> *	40	2,2-4,5	V, VIII	IV	32-57
64	<i>Bacillus vulgatus</i> *	20	4,5	V, VIII	IV, VI	32-69,30
65	<i>Clostridium album liquefaciens</i> n. sp. *	80	0,2-18,2	I, II, III, V, IX, XV	IV, VI	32
66	<i>Clostridium non liquefaciens</i> n. sp. *	240	0,6 2,6	III, V, VI, XV	IV, VI	32
67	<i>Clostridium minor</i> n. sp. *	150	0,2-4,5	I, V, VIII	IV, VI	32

NUMÉROS	ESPÈCES BACTÉRIENNES (1)	FACTEUR de répartition (2)	TENEUR EN EAU p. 100	NUMÉRO DE LA SURFACE D'EXPÉRIENCE	ÉPOQUE IV = avril VI = juin	RÉPARTITION en latitudes (3)
68	<i>Clostridium alboluteum</i> n. sp.*	660	0,6-1,5	II, III, VI	VI	32
69	<i>Clostridium centrosporogenes</i> *	160	0,6-2,2	III V, VI, XV	VI	32-69, 20
70	<i>Clostridium cochlearium</i>	100	0,4-18,2	V, XV	IV, VI	32-37
71	<i>Clostridium flammulosum</i>	80	48, 2	V, VIII	IV	32
72	<i>Clostridium hyalinum</i> n. sp.*	400	0,4-48,2	I, III, V, VI, XV	IV, VI	32
73	<i>Clostridium multifementans</i> *	50	1,5	II	VI	32-57
74	<i>Clostridium sphaeroides</i>	100	0,6	II	VI	32-69, 20
II. — Ordre : Actinomycetales.						
1 ^{re} famille : <i>Actinomycetales</i> .						
75	<i>Actinomycetes ciliolosa</i> *	20	2, 2	V	VI	32-46, 30
76	<i>Actinomycetes citreus</i>	140	0,98-2,2	V, VI	VI	32-46, 30
77	<i>Actinomycetes diastolicus</i>	120	2, 3	III	VI	32
78	<i>Actinomycetes flaveolus</i>	40	2, 2	V	VI	32
79	<i>Actinomycetes griseus</i>	60	2, 3	III	IV	32
80	<i>Actinomycetes nigricans</i> n. sp.	360	0,2-4,5	I, III, V, VI, VII, V II	IV, VI	32
81	<i>Actinomycetes purpureus</i> n. sp.	40	0,2-2,3	I, III, V	IV, VI	32
82	<i>Actinomycetes Saharæ</i> n. sp.	50	2, 2	V	VI	32

(1) Les espèces marquées d'un astérisque ont été isolées des échantillons de sol c'auffés pendant trois jours à 55°.

(2) Nous avons établi le pourcentage suivant lequel les différentes espèces se répartissent sur les différentes surfaces d'expérience, et calculé ensuite quel est le pourcentage de ces surfaces suivant lequel on trouve les diverses espèces; le produit de ces pourcentages représente le facteur de répartition.

(3) Les limites de répartition des espèces, en Europe, sont indiquées dans le travail de Fehér 1933.

espèces, nous avons annexé à notre liste les chiffres s'y rapportant.

Ces chiffres ont été obtenus en calculant, pour les surfaces étudiées, le pourcentage des différentes espèces de champignons et de bactéries et en déterminant quelle est la fréquence de ces espèces par rapport au pourcentage dans les surfaces étudiées; le produit de ces deux chiffres pourrait être qualifié de *facteur de répartition*.

Nous allons énumérer, dans ce qui suit, les espèces les plus typiques du sol désertique où ce facteur est au maximum :

Bactéries : *Bacillus cereus*, *Achromobacter candidans*, *Clostridium album liquefaciens* n. sp., *Proteus vulgaris*, *Clostridium alboluteum* n. sp., *Cellulomonas cellasea*, *Bacillus closterioides*, *Cellulomonas biazotea*, *Clostridium hyalinum* n. sp., *Actinomyces nigricans* n. sp., *Flavobacterium lacunatum*, *Cellulomonas minuscula*, *Cellulomonas bibula*, *Micrococcus candidans*, *Achromobacter delicatulum*, *Clostridium album non liquefaciens* n. sp., *Bacillus megatherium*, *Streptococcus terricola* n. sp. (fig. 20).

Champignons : *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma lignorum*; *Mucor mucedo*, *Mucor racemosus*, *Thamnidium elegans*, *Rhizopus nigricans*, *Macrosporium commune*, *Aspergillus candidus*, *Trichoderma Koningii*, *Penicillium crustaceum*, *Periconia atra* (fig. 21).

Parmi ces espèces figurent certaines, nouvellement découvertes, dont la diagnose est annexée à notre travail.

Si nous classons, par rapport à leur composition générique et par rapport au facteur de répartition, cette flore microbienne, nous aboutissons au résultat suivant :

Bactéries : *Clostridium* (2780), *Bacillus* (2700), *Cellulomonas* (2210), *Achromobacter* (2150), *Actinomyces* (940), *Proteus* (750), *Flavobacterium* (540), *Micrococcus* (300), *Streptococcus* (260), *Pseudomonas* (170), *Chromobacterium* (50), *Serratia* (20).

Champignons : *Aspergillus* (3851), *Mucor* (2738), *Trichoderma* (2145), *Rhizopus* (1145), *Penicillium* (990), *Thamnidium* (880), *Macrosporium* (760), *Periconia* (750), *Sporotrichum* (440), *Trichosporium* (220), *Helminthosporium* (220), *Trichothecium* (110), *Haplographium* (110).

17	<i>Penicillium candidum</i>	330	5,6-18,2	I, V	IV	32-69, 30
18	<i>Penicillium crustaceum</i>	550	0,2-18,2	I, III, V, VI, XV	IV, VI	32, 69, 20
19	<i>Penicillium silvaticum</i>	410	2,6	VI	IV	32
5° Sous-section : <i>Botrytiæ</i> .						
20	<i>Sporotrichum laxum</i> *	410	0,2	I	VI	32-69, 20
21	<i>Sporotrichum luteo album</i> *	410	4,5	II	VI	32
22	<i>Sporotrichum polysporum</i> *	220	0,4-0,6	III, XV	VI	32-69, 20
II. — Section : <i>Hyalodidymææ</i> .						
23	<i>Trichothecium roseum</i>	440	2,2	V	I VI	32-69, 30
2. FAMILLE : <i>Dematiaceæ</i> .						
I. — Section : <i>Phaeosporææ</i> .						
4° Sous-section : <i>Periconiææ</i> .						
24	<i>Periconia atra</i>	550	4,5-18,2	II, V	IV, VI	32
25	<i>Periconia ellipsozona</i>	250	3,5	II	IV	32
6° Sous-section : <i>Trichosporiææ</i> .						
26	<i>Trichosporium fuscum</i>	220	0,2-2,2	I, V	I VI	32
8° Sous-section : <i>Haplographiææ</i> .						
27	<i>Haplographium chlorocephalum</i> .	440	18,2	V	I IV	32
III. — Section : <i>Phaeophragmiææ</i> .						
3° Sous-section : <i>Helminthosporiææ</i> .						
28	<i>Helminthosporium folliculatum</i> .	220	5,6	I	I IV	32
IV. — Section : <i>Phaeodictyææ</i> .						
3° Sous-section : <i>Macrosporiææ</i> .						
29	<i>Macrosporum commune</i>	760	0,6-2,6	III, IV, VI	I IV, VI	32

Nota. — Voir au tableau V les notes en bas de page.

TABLEAU VII. — Espèces d'Algues isolées du sol désertique.

NUMÉROS	ESPÈCES D'ALGUES (1)	FACTEUR de répartition (2)	TENEUR EN EAU p. 100	NUMÉROS de la surface d'expérience	ÉPOQUE IV = avril VI = juin	RÉPARTITION par latitude (3) en degrés
<i>Schizophyta : Schizophyceæ.</i>						
1	<i>Anabaena circulans</i> , n. A. (4)	80	18,2	V	IV	32
2	<i>Anabaena torulosa</i>	272	2,3	III	IV	32
3	<i>Aphanocapsa endolitica</i> , n. A.	208	0,98	VI	VI	32
4	<i>Aphanocapsa Koordersi</i> , n. A.	64	0,98	VI	VI	32
5	<i>Aphanocapsa musicola</i> , n. A.*	32	0,6	III	VI	32
6	<i>Aphanocapsa rupicola</i> , n. A.*	48	0,6	III	VI	32
7	<i>Aphanocapsa testacea</i> , n. A.*	82	0,6	VI	VI	32
8	<i>Chroococcus minimus</i> , n. A.*	500	0,98-2,2	V, VI	VI	32-69,20
9	<i>Chroococcus minutus</i> , n. A.	165	0,6-2,2	II, III, V	VI	32-69,30
10	<i>Chroococcus schizodermaticus</i>	80	0,2-2,6	I, VI	IV	32-69,20
11	<i>Chroococcus turgidus</i>	32	18,2	V	IV	32
12	<i>Calothrix parietina</i> , var. <i>aficana</i> , n. A.	48	2,6	VI	IV	32-49,20
13	<i>Dactylococcopsis rupestris</i>	132	0,2	I	IV	32
14	<i>Eucapsis alpina</i> , n. A.*	128	0,4-1,5	II, XV	VI	32
15	<i>Gloeocapsa compacta</i> *	64	0,98	VI	VI	32
16	<i>Gloeocapsa gigas</i>	160	2,3	V	VI	32
17	<i>Gloeocapsa sabulosa</i>	80	0,6	III	VI	32
18	<i>Gloeocapsa stagnophila</i>	304	18,2	V	IV	32
19	<i>Gloethece coerulescens</i>	272	18,2	V	IV	32
20	<i>Microcystis firma</i>	250	2,3	III	IV	32
21	<i>Microcystis fusciculata</i> , n. A.*	64	0,2-2,2	I, III, V	VI	32-51
22	<i>Microcystis pulverea</i> *	330	0,4	XV	VI	32
23	<i>Nostoc calcicola</i> , n. A.	330	0,4-2,6	II, V, VI	IV, VI	32-69,20
24	<i>Nostoc communis</i>	160	1,5-1,8,2	II, III, V	VI	32-69
25	<i>Nostoc Linckia</i> *	330	0,6	III	VI	32-69,30
26	<i>Nostoc paludosum</i> , n. A.	96	0,4-3,5	II, XV	IV, VI	32
27	<i>Oscillatoria homogenea</i> , n. A.	96	3,5	II	IV	32
28	<i>Oscillatoria jervensis</i> , n. A.	96	3,5	II	IV	32
29	<i>Oscillatoria Nestini</i> , n. A.	16	2,2	V	VI	32
30	<i>Oscillatoria</i>	16	2,2	V	VI	32

Zygophyta.

38	<i>Scytonema arangelii</i> , f. <i>minor</i> , n. A.	48	0,2	I	VI	32
39	<i>Siphonomena polonicus</i> , n. A.	24	0,2-0,6	I, III	VI	32
40	<i>Symploca tubia</i>	48	0,2	I	VI	32-52,40
41	<i>Slig-nema minutum</i> , n. A.	96	0,2	I	VI	32
42	<i>Cylindrocapsa Brebissonii</i>	456	0,4	XV	VI	32-69,30
43	<i>Mastogloia Macdonaldi</i> , n. A.	48	0,2	I	VI	32
44	<i>Phylodinium simplex</i> , n. A.	96	2,6	VI	I, IV	32
45	<i>Spirotaenia endospira</i> , n. A.	64	2,2	V	I, II	32-60,30
46	<i>Botrydiopsis arrhiza</i> , n. A.	1.000	0,2-18,2	I, II, III, V, VI, XV	IV, VI	32
47	<i>Botrydiopsis minor</i> , n. A.	264	2,2-18,2	V, VI	IV, VI	32
48	<i>Botrydiopsis turfosa</i> , n. A.	250	0,6-1,5	II, III, V	VI	32
49	<i>Chlamydomonas spec.</i> , n. A.	46	2,2	V	VI	32-47,47
50	<i>Chlorobotrys neglecta</i> , n. A.	460	0,6	III	VI	32-60,17
51	<i>Chlorobotrys polycularis</i> , n. A.	528	0,6-18,2	II, III, V, VI	IV, VI	32
52	<i>Chlorella vulgaris</i> , n. A.	462	0,2-2,6	I, III, VI, XV	IV, VI	32-69,30
53	<i>Chlorocloster terrestris</i> , n. A.	504	0,4-18,2	II, III, V, VI, XV	IV, VI	32-69,30
54	<i>Chlorococcum africanum</i> , n. A.	465	2,3-3,5	II, III	IV	32
55	<i>Chlorococcum caldarium</i> , n. A.	32	0,6	III	VI	32-69,30
56	<i>Chlorococcum humicolum</i> , n. A.	300	0,2-2,2	I, V, XV	VI	32
57	<i>Chlorococcum infusum</i> , n. A.	46	2,2	V	VI	32
58	<i>Chlorosarcina minor</i> , n. A.	132	0,4-2,2	V, XV	VI	32-69,30
59	<i>Coccomyxa dispersa</i>	230	0,4-0,98	III, VI, XV	VI	32-69,20
60	<i>Cystococcus humicola</i> , n. A.	726	0,2-18,2	I, III, V, VI	IV, VI	32
61	<i>Dactylothece Braunii</i> , n. A.	950	0,2-2,2	I, II, III, V, VI, XV	IV, VI	32-48,40
62	<i>Dictyosphaerium Ehrenbergianum</i> , n. A.	528	0,2-3,5	I, II	VI	32
63	<i>Elacatolhriz acuta</i> , n. A.	64	0,4	XV	VI	32-60,17
64	<i>Elacatolhriz gelatinosa</i> , n. A.	412	1,5	II	VI	32-69,30
65	<i>Eremosphaera viridis</i> , n. A.	512	2,6	VI	IV	32
66	<i>Eremosphaera viridis terricola</i>	428	2,6	VI	IV	32
67	<i>Gloeococcus Schroeteri</i>	32	0,6	III	VI	32
68	<i>Gloeocystis betryctidis</i> , n. A.	528	0,2-1,5	I, II, III, VI	VI	32
69	<i>Gloeocystis rupestris</i> , n. A.	64	0,4	XV	VI	32
70	<i>Gloeocystis resculosa</i> , n. A.	132	0,2-1,5	II, XV	VI	32-66,50
71	<i>Gloeotila protogenita</i> , n. A.	48	0,2	I	VI	32
72	<i>Leptosira Mediana</i> , n. A.	48	0,2	I	VI	32

Euthallophyta : Chlorophyceae.

NUMÉROS	ESPÈCES D'ALGUES (1)	FACTEUR de répartition (2)	TENEUR EN EAU p. 100	NUMÉRO de la surface d'expérience	ÉPOQUE IV = avril VI = juin	RÉPARTITION par latitude (3) en degrés
73	<i>Oocystis elliptica</i> , var. <i>africana</i> , n. A.	176	4,5	II	VI	32
74	<i>Planophila asymetrica</i> , n. A.	64	2,2	V	VI	32
75	<i>Placochloris commutata</i>	498	0,98-2,2	III, VI	IV, VI	32-57
76	<i>Plutococcus vulgaris</i>	330	0,2-2,3	I, II, III, VI	IV, VI	32-59, 30
77	<i>Protococcus viridis</i>	64	2,6	VI	IV	32
78	<i>Schizochlamys gelatinosa</i>	450	0,2-1,5	I, II, III	V	32-69, 20
79	<i>Schizochlamys triatini</i> , n. A.	66	2,3-2,6	III, VI	IV	32
80	<i>Stichococcus bacillaris</i>	256	2,3	III	IV	32-57
81	<i>Tetraspora lubrica</i> , n. A.	32	2,2	V	VI	32-66, 50
82	<i>Trochiscia aspera</i> , n. A.	64	0,4	XV	VI	32-60, 17
83	<i>Trochiscia hirta</i> , n. A.	400	0,6-1,5	II, III, VI	VI	32-69, 30
84	<i>Trochiscia minor</i> , n. A.	256	2,2	V	VI	32
85	<i>Vaucheria pachyderma</i>	297	2,3-2,6	III	IV	32
86	<i>Westella botryoides</i> , n. A.	304	2,2	V	IV	32

(1) n. A., nouveau pour l'Afrique du Nord, ne figurant pas dans la thèse de M^{me} L. Gauthier.

Nota. — Voir au tableau V les notes en bas de page.

La présence d'Algues dans les sols désertiques.

Nous avons pu trouver qu'il existe des algues en toute saison, même pendant la sécheresse estivale, dans les sols du désert. Il est malheureusement impossible, en l'état actuel des méthodes de culture, de séparer leurs états actifs des états enkystés. On ne peut donc que supposer qu'elles passent l'été sous forme de spores et qu'elles renaissent à la vie aux époques relativement plus humides. Comme tous nos échantillons proviennent d'une profondeur de 10 à 15 centimètres, il en résulte que les algues en

question peuvent s'adapter à une lumière très atténuée.

Pour établir le « facteur de répartition » de ces organismes, tableau VII, nous avons procédé de la même façon que pour les bactéries et les champignons.

Grâce à cette méthode, nous avons pu établir quelles sont les espèces dominantes. Il s'agit de : *Botrydiopsis arrhiza*, *Dactylothece Braunii*, *Cystococcus humicola*, *Chlorobotrys polyclaris*, *Dictyosphærium Ehrenbergianum*, *Glæocystis botryoides*, *Eremosphæra viridis*, *Chlorocloster terrestris*, *Chlorococcus minimus*.

Dans le tableau VIII, ensuite, nous avons groupé ces algues par rapport à leurs fluctuations saisonnières.

TABLEAU VIII. — Changements saisonniers
du nombre des algues dans les sols désertiques.

NUMÉROS	NUMÉRO de la surface d'expérience	ÉPOQUE	NOMBRE des algues	SCHIZOPHYTES p. 100	ZYGOPHYTES p. 100	CHLOROPHYTES p. 100
1	I	Juin.	640	34	6	60
2	II	Avril.	4.800	34		66
		Juin.	700	15		85
3	III	Avril.	1.960	37		63
		Juin.	840	36		64
4	V	Avril.	6.700	28		72
		Juin.	2.000	30	4	66
5	VI	Avril.	3.960	48	4	78
		Juin.	1.060	30		70
6	XV	Juin.	440	32	9	59

Il est évident que la diminution de la teneur hydrique en été constitue pour elles, comme pour les autres micro-organismes, le facteur limitant par excellence.

Nous avons enregistré, avec surprise, le fait nouveau que, malgré l'extrême sécheresse des sols sahariens en été, les algues s'y maintiennent.

Un autre fait particulier se manifeste ensuite : Les différents groupes systématiques n'y figurent pas d'une façon uniforme. Ainsi voit-on prédominer les Chlorophycées, grâce à leur faculté de produire de nombreuses spores.

TABLEAU IX. — Nombre des algues dans les échantillons de sol, exposés à 55° C.

NUMÉRO de la surface d'expérience	NOMBRE D'ALGUES		SCHIZOPHYTES	CHLOROPHYTES
	au départ	à 55° C		
I	640	340	29	71
II	700	460	39	61
III	840	380	42	58
V	2.000	600	24	76
VI	1.060	340	33	65
XV	440	240	40	60

En même temps, ces algues supportent un maximum de lumière, contrairement aux Schizophytes et aux Zygophytes qui préfèrent un éclaircissement moins intense. C'est bien pour cette raison qu'on voit prédominer ces derniers dans les sols européens, en hiver et en automne. Dans les sols désertiques, au contraire, leur nombre est extrêmement restreint.

Nous n'insisterons pas sur les Flagellés, car nous avons passé le matériel saharien à M. L. Varga qui en fera une étude monographique.

Quant à la résistance des algues aux températures élevées, nous avons exposé les sols pendant soixante-douze heures à une température de 55° C. Par ce traitement, leur nombre a diminué dans de larges proportions. Seules, les espèces signalées par un * (tableau IX), ont pu être recélées dans nos cultures.

III. — LES CARACTÈRES CHIMICO-PHYSIQUES DES SOLS DÉSERTIQUES ÉTUDIÉS.

Dans la figure 17 et le tableau X, nous exposons la teneur en matières nutritives des différents sols.

Il est un fait frappant au premier chef : Tous ces sols sahariens renferment relativement beaucoup d'azote nitrique. Son abondance peut s'expliquer par les résultats de nos relevés microbiologiques qui démontrent l'existence d'une nitrification active, malgré la grande sécheresse qui caractérise ces sols ; le NO₃ formé n'est pas lessivé, faute de pluies.

En ce qui concerne l'Az total, son taux est relativement faible, si on le compare à celui des sols non désertiques et qui est de 100 milligrammes : g, en moyenne, sur le littoral algérien ;

TABLEAU X. — Résultats des analyses chimiques.

NUMÉRO des surfaces d'expérience	P ₂ O ₅ TOTAL = P _t mg./100 g.	P ₂ O ₅ Soluble acide citrique = P _c mg./100 g.	P _t / P _c	K ₂ O TOTAL = K _t mg./100 g.	K ₂ O Soluble acide citrique = K _c mg./100 g.	K _t / K _c	AZ TOTAL mg./100 g.	AZ NITRIQUE mg./100 g.	CaCO ₃ p. 100	HUMUS p. 100	C mg./100 g.	C/Az	CONDUCTIVITÉ x 10 — 5
I	45,00	1,39	32,4	48,40	4,76	27,3	14,00	6,00	24,8			43	13,21
II	58,80	6,48	9,1	54,20	2,04	26,6	11,20	7,77	28,8	0,49	110	10	
III	40,20	1,28	31,4	44,30	1,25	35,4	22,40	5,46	20,0	0,7	447	19	23,17
IV	62,70	11,80	5,3	56,56	2,41	23,6	64,10	5,67	17,2	0,98	564	9	97,44
V	69,08	14,78	4,7	60,86	2,90	20,9	11,20	6,93	18,4	0,43	219	22	63,34
VI	48,04	2,04	23,6	50,70	2,29	22,4	16,80	3,78	14,8	0,93	539	32	
VII		2,62			4,53		14,00	6,51	4,0	0,12	70	5	13,03
VIII	68,30	12,06	5,7	65,30	5,90	11,4	47,60	5,25	7,2	0,25	445	3	69,43
IX		3,92			2,79		25,20	5,88	12,8	0,25	145	5	
X		9,66			4,65		19,40	5,88	8,0	0,46	267	13	43,02
XI		2,86			3,73		16,80	4,44	23,2	0,43	249	15	60,39
XII		11,30			6,84		58,80	3,57	12,8	0,20	168	3	31,24
XIII		9,06			2,48		41,20	3,78	32,0	0,68	394	35	9,20
XIV		0,76			4,26		8,10	5,04	24,0	0,59	342	45	
XV	40,42	1,77	22,6	42,00	1,83	22,9	8,40	6,30	3,2	0,26	151	18	23,44
XVI		1,96			4,48		11,20	4,62	17,6	0,38	220	20	59,07

mais il est élevé, malgré tout, par rapport aux quantités très faibles d'humus que nous avons pu doser. C'est là un fait important qui prouve qu'il s'effectue, même dans les sols désertiques, une fixation de l'Az atmosphérique. En effet, nous avons pu révéler, au printemps (tableau I), la présence non seulement d'espèces nitrifiantes, mais aussi d'espèces fixatrices de l'Az.

En ce qui concerne les sels potassiques et phosphoriques on les dose, dans les travaux plus récents, sous leur forme soluble et par conséquent, immédiatement absorbable par les racines végétales.

Toutefois, pour nous rendre compte quel est le capital de ces matières nutritives, extrêmement importantes, nous avons dosé également la fraction peu soluble, donc ce qu'on appelle le K et le P total.

Or, il résulte de nos déterminations, que le taux du K et du P, en particulier leur fraction soluble dans l'acide citrique, se maintient, en général, au-dessous de la moyenne. Il existe entre ce K₂O et le P₂O₅ un antagonisme net que l'un de nous a, d'ailleurs, constaté antérieurement : F. avait trouvé, par ses recherches, que le P₂O₅ est absorbé par le sol en proportion

inverse par rapport au K_2O ; il est impossible d'en préciser les raisons, à l'heure actuelle.

De toute façon il ressort très nettement de notre relevé que dans les mauvais sols qui sont également biologiquement très inactifs, la teneur en acide phosphorique est particulièrement faible et inversement.

On ne s'étonnera donc pas de trouver un rapport entre le nombre microbien et la teneur en phosphates (fig. 18).

Quant à leur contenu en K, nos sols se classent à peu près de la même façon, mais la série est moins régulière.

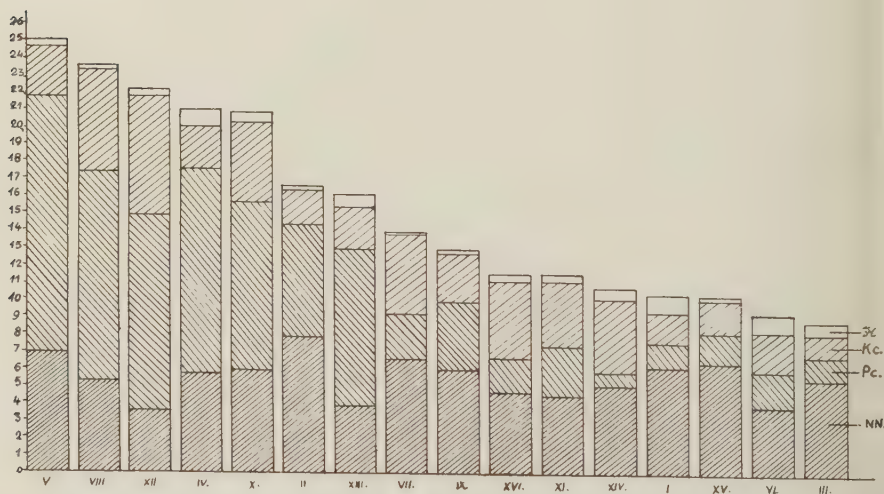


FIG. 17. — La teneur en matières nutritives des stations d'expérience en mg./100 g. de sol.

H, humus; KC, K_2O soluble en acide citrique; PC, P_2O_5 soluble en acide citrique; NN, azote nitrique.

Si nous dosons à présent le P et le K total, nous trouvons, dans nos surfaces d'expérience, des chiffres plus élevés. Ils se rapprochent tout à fait de ceux signalés sur le littoral algérien, et les dépassent même, pour les dunes.

Ces chiffres deviennent intéressants, si l'on établit leur rapport avec ceux relatifs au K et au P solubles dans l'acide citrique et dont il sera question dans le chapitre suivant.

Quant à la teneur en humus de nos sols sahariens, elle est extrêmement faible par suite de la dégradation trop rapide de

la matière organique en été. Au point de vue pratique, l'enrichissement en humus constitue, par conséquent, un desideratum particulièrement important pour la productivité des sols désertiques.

Pour ce qui est des facteurs physiques, nos mesures ont abouti aux résultats suivants, résumés dans le tableau XI.

En été, il y a augmentation, dans tous les sols, des particules solides, donc tassement. La capacité en air et la capacité en eau diminuent, en proportion inverse, de même la teneur en eau des sols sahariens diminue très rapidement.

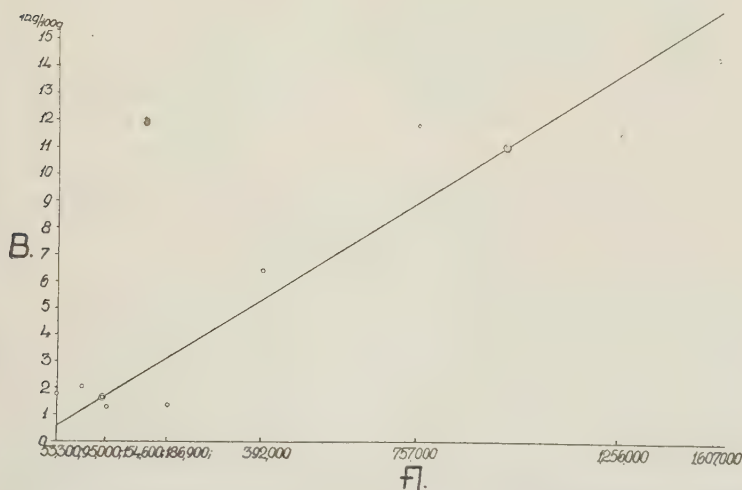


FIG. 18. — Le rapport entre la teneur en microorganismes (Bactéries et Champignons) et la teneur en acide phosphorique, soluble en acide citrique.

A, teneur en microorganismes : g. de sol humide; B, teneur en acide phosphorique, soluble en acide citrique, mg./100 g.

Un autre fait, très intéressant, a pu être révélé à cette occasion : la teneur en air a fortement diminué dans le sol I (dune locale) par suite de son tassement excessif. Au contraire, dans le sol V (oasis cultivé) ce facteur va en augmentant par suite de la diminution plus rapide et proportionnellement plus intense de sa teneur en eau. A cette augmentation des particules solides en été, correspond une diminution importante de la capacité en eau.

En ce qui concerne les résultats de l'analyse mécanique,

TABLEAU XI. — Résultats des analyses physiques.

NUMÉRO des surfaces d'expérience	ÉPOQUE	TENEUR EN AIR p. 100 du volume	TENEUR EN EAU p. 100 du volume	PARTICULES SOLIDES p. 100 du volume	CAPACITÉ EN AIR p. 100 du volume	CAPACITÉ EN EAU p. 100 du volume	pH	TENEUR EN EAU p. 100 du poids	TEMPÉRATURE du sol	TEMPÉRATURE de l'air
I	Avril.	44,6	8,0	47,4	8,8	43,8	8,36	5,6	27	32
	Juin.	30,0	0,4	69,6	6,2	21,2	8,53	0,2		
II	Avril.	45,5	5,3	49,2	5,1	45,7	8,40	3,5	28	32
	Juin.	42,8	2,3	54,9	4,1	41,0	8,15	1,5		
III	Avril.	38,2	3,9	57,8	4,5	37,7	8,55	2,3	25,3	28
	Juin.	31,6	0,9	61,5	3,9	35,6	7,84	0,6		
IV	Avril.	48,2	7,2	44,2	5,8	50,0	8,52	5,4 ₈	25	30
V	Avril.	32,2	26,5	45,3	4,0	54,7	8,80	18,2	25	30
	Juin.	46,0	3,2	50,8	4,6	44,6	8,52	2,2		
VI	Avril.	52,0	2,6	45,4	10,0	44,6	8,35	2,6	24	28
	Juin.	45,0	1,4	53,6	5,2	41,2	8,24	0,98		
XV	Avril.	45,6	1,7	52,7	8,1	39,2	8,55	1,9	27,5	28,5
	Juin.	45,4	0,7	53,9	5,3	40,8	8,59	0,4		
XVI	Avril.	28,0	18,8	53,2	4,8	42,0	8,50	10,6		

nous avons trouvé un minimum de limon et d'argile dans les dunes [p. e. 3,9 p. 100 dans les dunes de Zenaga (I) et 1,9 p. 100 dans celles de Zousfana (XV)]; les particules plus petites que 0,2 mm., y occupent une partie importante (75,6 et 71,5 p. 100); or, le manque d'argile entraîne une forte perméabilité qui, à Zousfana, déprime le taux de l'Az.

Tout autrement les autres types de sols, toujours bien plus riches en particules dispersées.

Je choisis comme exemple la palmeraie dépérissante (VI) [45,1 p. 100], le reg (III) [29,8 p. 100] — avec 58 p. 100 de terre fine seulement et 42 p. 100 de cailloux — la palmeraie cultivée (V) [31,2 p. 100], et surtout l'argile (II) [57,1 p. 100]; aussi le taux d'Az y est généralement plus élevé.

Étant donnée la teneur élevée en CaCO_3 de tous nos sols, leur pH est généralement voisin de la neutralité ou faiblement alcalin et ne présente que peu de fluctuations saisonnières.

La conductivité électrique et la teneur en sels totaux qui lui correspond, représentent un autre caractère extrêmement important de nos sols.

Pour nous rendre compte du rapport qui existe entre lui et la teneur en matières nutritives, nous avons additionné les chiffres relatifs à l'Az nitrique, au K et P solubles dans l'acide citrique et nous en avons fait le quotient (fig. 19).

En ce qui concerne la teneur en Cl des sols étudiés, et que nous avons vérifiée sur de nombreux échantillons prélevés aux environs de nos surfaces d'expérience, elle est généralement faible au printemps (de 0,001 à 0,025 p. 100) et s'élève peu en été (0,008 à 0,080 p. 100); exceptionnellement, elle atteint un taux de 0,3 p. 100 (palmeraie dépérissante VI).

Ces données confirment les résultats auxquels était antérieurement arrivé Harder.

Application pratique de nos résultats pour l'utilisation rationnelle des sols désertiques.

Il est prouvé par les résultats de nos recherches qu'il existe des micro-organismes dans tous les types de sols sahariens. Cette preuve a été fournie, définitivement, d'abord par la détermination de leur capital microbien; ensuite, nos dosages de CO₂ ont démontré que ces micro-organismes sont à l'état de vie active.

Ces faits ont une valeur théorique et pratique indiscutable. Nous avons suivi les manifestations microbiennes non seulement à l'époque favorable relativement humide, mais aussi en saison sèche où la teneur hydrique du sol, par suite des températures élevées, est déprimée au minimum.

Malgré les conditions, défavorables à l'extrême, la présence de micro-organismes actifs a pu être démontrée même en cette saison. Ces observations réfutent définitivement toutes les anciennes hypothèses relatives aux limites inférieures de l'humidité du sol pour la vie microbienne.

Bactéries et champignons du sol sont à même, grâce à leur faculté d'adaptation extraordinaire, de continuer leur activité dans des conditions qu'on jugeait autrefois limitatives pour la vie microbienne.

Voilà nos principaux résultats; nos recherches ne présentent, bien entendu, qu'un caractère provisoire, et pour acquérir des renseignements définitifs il est absolument indispensable de les étendre jusqu'au cœur du Sahara.

Mais nos investigations, à côté de leur importance théorique, présentent en même temps quelque intérêt pratique. Pour cette raison elles n'ont pas porté unilatéralement sur le côté micro-biologique du problème; nous avons attaché un intérêt tout particulier à étudier simultanément la teneur en matières nutri-

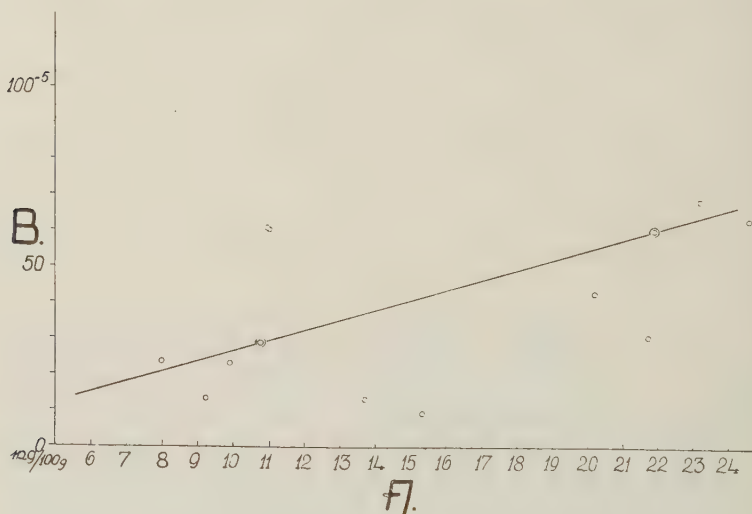


FIG. 19. — Le rapport entre la concentration des sels solubles et la conductivité.

A, teneur en nitrates, P et K solubles en acide citrique en mg./100 g. de sol;
B, conductivité électrique.

tives des sols considérés, comme le prouvent la figure 17 et le tableau X annexé à ce travail.

Il a été établi, en 1929, par les différentes Commissions de la Société Pédologique Internationale, à l'appui d'un matériel très étendu, quelles sont les limites inférieures des principales matières fertilisantes permettant le développement normal des plantes cultivées. On a trouvé ainsi une limite inférieure de :

150 mg. : kg. de sol pour l'Az.

250 mg. : kg. de sol pour le P soluble à l'acide citrique.

160 mg. : kg. de sol pour le K soluble à l'acide citrique.

Si nous comparons ces chiffres à ceux que nous venons de relever pour nos sols sahariens, il en résulte qu'une partie seulement d'entre eux renferme ce minimum indispensable. Seuls, les sols d'oasis à Beni Ounif IV, V et VIII, et, à la rigueur, le sol XII à Fendi, contiennent des taux élevés de P_2O_5 ; tous les autres ne se rapprochent que de très loin du minimum. Ce résultat s'explique d'ailleurs aisément par le fait que les sols d'oasis, ou du moins une partie, sont fumés, quoique insuffisamment; par le fait, la teneur en P_2O_5 , soluble en acide citrique, et par conséquent assimilable, est bien plus élevée que la teneur en K soluble en acide citrique. Il semble certain qu'il existe une série de bactéries transformant les combinaisons phosphoriques solubles en combinaisons facilement solubles et pouvant être absorbées par les racines.

Il y a, en effet, un rapport net entre le taux du P_2O_5 soluble en acide citrique et l'activité microbienne des sols (fig. 18).

La teneur en K_2O soluble en acide citrique est également faible dans les sols considérés et se maintient dans des limites situées en dessous du minimum. On peut s'imaginer que la transformation des combinaisons potassiques insolubles du sol en combinaisons solubles est également du domaine microbien, mais les rapports sont bien moins précis que pour les combinaisons phosphoriques.

D'autre part, on peut admettre que les sols désertiques sont insuffisamment pourvus de combinaisons phosphoriques et potassiques solubles précisément parce que les conditions microbiologiques sont défavorables; car le capital global en K et en P dépasse effectivement de beaucoup la limite inférieure, tel qu'il ressort de nos dosages. Il est évident que dans tous les cas le facteur limitant est l'eau.

Considérons à présent le facteur Az. Contrairement au facteur P, et surtout au facteur K, il est, lui, intimement lié aux phénomènes microbiologiques tels que la fixation de l'Az atmosphérique et la nitrification. D'autre part, les sels azotés, en particulier le KNO_3 , plus facilement solubles, sont plus rapidement lavés dans le sous-sol; il en résulte que son taux est infiniment plus variable, contrairement à ce qui se passe pour le P_2O_5 et le K_2O , solubles en acide citrique. Or, il est

un fait indiscutable que l'azote total des sels désertiques est en général suffisant. Ce fait, pourrait bien être en rapport avec la fixation de l'Az atmosphérique qui doit jouer un rôle important dans les sols désertiques. La teneur élevée en Az ne peut, d'aucune façon, être en rapport avec la présence d'humus, son taux étant trop insignifiant.

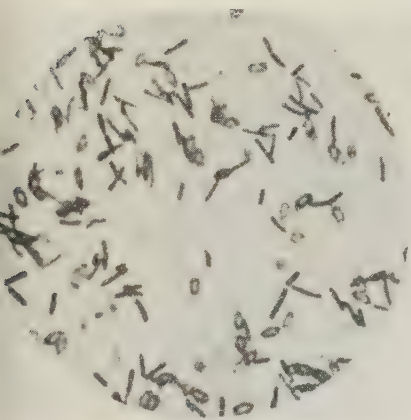
Ce déficit en humus ressort d'ailleurs également du taux bas du facteur G : Az (tableau X).

Il en résulte donc que les conditions biologiques des régions désertiques répondent tout à fait aux besoins des espèces qui fixent l'Az. Il est d'ailleurs un fait incontestable que la nitrification et la présence d'organismes nitrificateurs ont pu être révélées pour la plupart des sols (1) ; on peut admettre que leur nombre augmente davantage lorsque les conditions de vie sont plus favorables.

Il résulte de ce qui précède qu'en créant des conditions de vie optimales pour les micro-organismes du désert, on stimulerait leur activité ; par le fait, la nitrification, de même que la fixation de l'Az atmosphérique, subirait une hausse telle qu'on pourrait utiliser tous ces sols sans se servir d'engrais azotés artificiels. D'autre part, la réserve de K et de P total serait largement suffisante pour permettre le ravitaillement en K et en P soluble en acide citrique des plantes cultivées. Par conséquent, l'activité de la vie microbienne pourrait suppléer, au désert, à l'emploi d'engrais artificiels. L'utilisation de ces derniers ne peut, bien entendu, qu'entraîner des conséquences heureuses en augmentant le taux des matières organiques.

Par conséquent, la régularisation du ravitaillement en eau, l'emploi d'engrais et l'amélioration des caractères physiques du sol représentent les buts à poursuivre pour augmenter la productivité des sols désertiques, en stimulant l'activité microbienne. La méthode est donc essentiellement d'ordre biologique. On pourrait arriver au résultat voulu aux endroits où existe la possibilité d'irrigation sans avoir recours à l'emploi d'engrais coûteux.

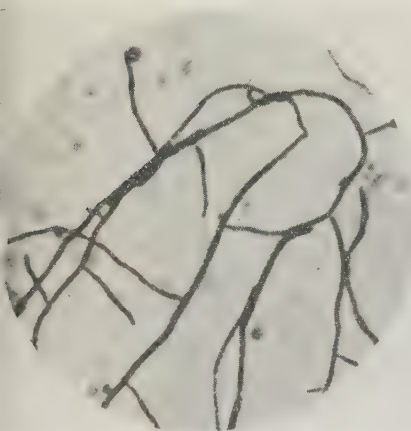
(1) Nos observations, à cet égard, infirment les conclusions de Rivkind (*loc. cit.*, p. 93, ligne 29).



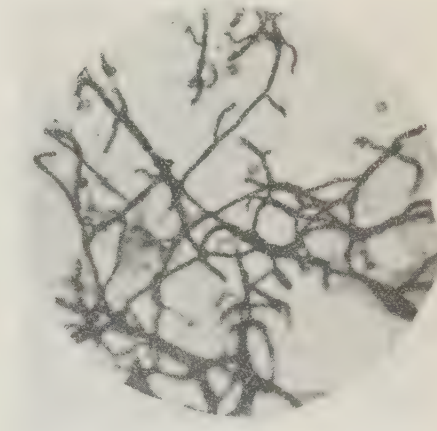
a) *Clostridium album liquefaciens* n. sp.
Gross. : 1/500.



b) *Clostridium album non liquefaciens* n. sp.
Gross. : 1/500.

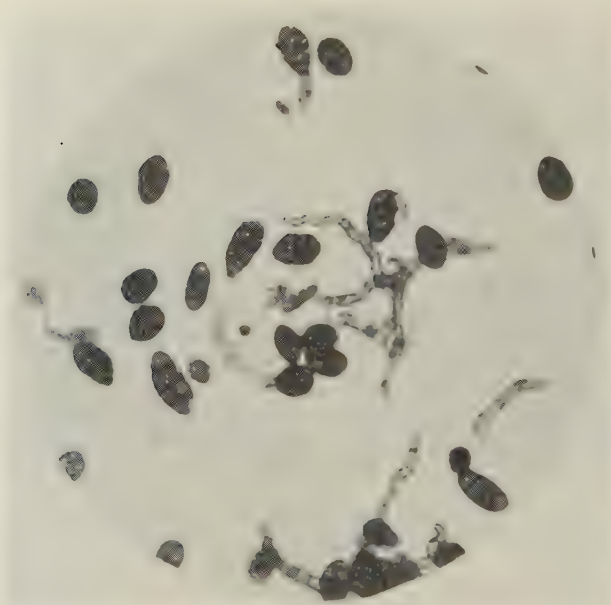


c) *Actinomyces purpureus* n. sp.
Gross. : 1/500.

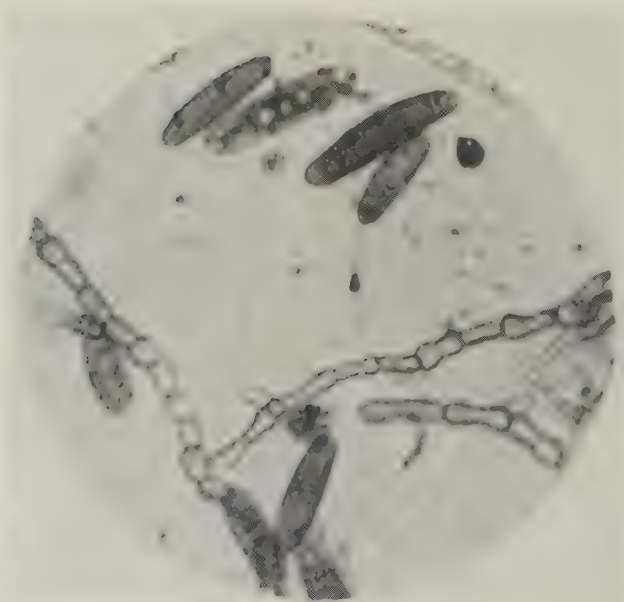


c) *Actinomyces Saharæ* n. sp.
Gross. : 1/500.

FIG. 20. — Nouvelles espèces de Bactéries sahariennes.
Voir page 619 où figurent leurs diagnoses.



a) *Microsporium commune*.

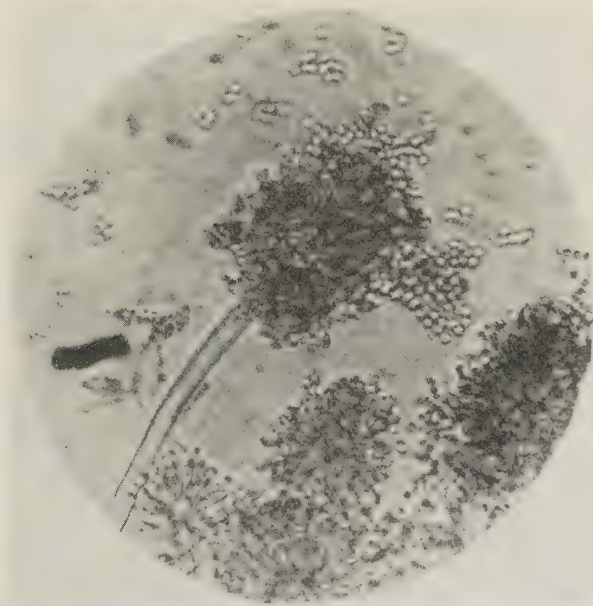


b) *Helminthosporium folliculatum*.

Résumé.

Nos recherches relatives à la microbiologie des sols, qui sont les premières de ce genre, faites au Sahara, ont abouti aux résultats généraux suivants :

1° Il a été prouvé que malgré la teneur minime en eau



c) *Aspergillus fumigatus*.

FIG. 21. — Champignons sahariens.

des sols désertiques et malgré les températures extrêmement élevées auxquelles ils sont exposés, ils renferment toujours des micro-organismes à l'état de vie active.

2° Nous avons, d'une part, déterminé les nombres des bactéries, des champignons et des algues du sol, d'autre part nous les avons classés par leur fréquence, de manière à faire un relevé des espèces constantes des sols sahariens. Plusieurs nouvelles espèces ont été découvertes à cette occasion.

3° Il nous importait non seulement de connaître la composition microbiologique des sols sahariens, mais aussi de relever l'intensité de la vie active de ces micro-organismes. La mesure de la respiration du sol nous en a fourni un excellent critérium.

4° Grâce à ces mesures on ne peut plus maintenir l'ancienne opinion suivant laquelle le sol saharien sec est presque stérile. Il faut au contraire admettre que les micro-organismes du sol désertique se sont accoutumés à ses conditions écologiques, extrêmement défavorables.

Pour le moment nous ne pouvons décider où commence la limite inférieure pour la vie du désert.

5° Nous avons pu établir qu'il existe un rapport net entre la capacité en air, la teneur en eau du sol, et les nombres microbiens d'une part et la respiration du sol de l'autre; il y a, de même, des relations directes entre son taux hydrique et sa teneur en micro-organismes.

6° Le sol saharien contient tous les groupes biologiquement intéressants de bactéries, tel que les fixateurs d'Az, les nitrificateurs, les cellulolytiques et les uréolytiques.

7° Le taux élevé en Az total, de même que la présence constante de nitrates prouvent que les sols désertiques non seulement renferment les organismes fixateurs d'Az et nitrificateurs, mais que ceux-là sont à l'état de vie active. Voilà un fait nouveau d'un grand intérêt pratique.

Il prouve que si l'on créait des conditions favorables à l'activité biologique des micro-organismes il serait possible d'utiliser les sols sahariens sans l'emploi d'engrais coûteux.

8° Le dosage de l'élément P en particulier a prouvé que la réserve en P est plus que suffisante pour le ravitaillement en sels phosphoriques des plantes cultivées, si l'on réussit à améliorer les conditions biologiques et à transformer les phosphates insolubles en phosphates solubles, assimilables par les plantes cultivées. Les micro-organismes qui se chargent de cette transformation auraient donc un rôle biologique de premier ordre. Nous avons, en effet, pu démontrer, par nos mesures, qu'il existe un rapport net entre l'activité biologique des sols désertiques et leur teneur en phosphates solubles. Ce fait prouve qu'en améliorant les conditions biologiques et aussi

les conditions physiques des sols, en créant en particulier de bonnes conditions d'irrigation on peut suppléer aux besoins en phosphates des plantes, sans l'emploi d'engrais artificiels.

9° Ce qui vient d'être dit s'applique aussi en grandes lignes à la teneur en K du sol désertique.

10° Finalement la mesure de la conductivité électrique s'est révélée comme étant particulièrement apte à caractériser la teneur en sels nutritifs.

11° Nos recherches, à part leurs résultats théoriques nouveaux ont abouti au résultat inédit que les conditions microbiologiques du sol jouent un rôle capital pour l'augmentation de leur productivité. Il est établi que si l'on réussit à créer des conditions physiques favorables pour l'activité de la microflore on pourrait ainsi assurer, en grande partie, le ravitaillement des plantes et éviter l'achat onéreux d'engrais.

Diagnose des nouvelles espèces de bactéries trouvées dans les sols désertiques (fig. 20).

1. *Streptococcus terricola* n. sp.

Agar extrait de sol : Colonies rondes, luisantes, blanches au début, confluentes plus tard.

Gélatine : n'est pas liquéfiée.

Lait tournesolé : acidifié.

Grandeur : 0,8-1,2 μ .

Gram +.

2. *Streptococcus aurantiacus* n. sp.

Agar extrait de sol : colonies orangées.

Gélatine : n'est pas liquéfiée.

Lait tournesolé : neutre.

Grandeur : 1,0-1,2 μ .

Gram +.

3. *Streptococcus luteus* n. sp.

Agar extrait de sol : colonies jaunes, confluentes.

Gélatine : n'est pas liquéfiée.

Lait tournesolé : neutre.

Grandeur : 0,2-0,3 μ .

Gram +.

4. *Clostridium album non liquefaciens* n. sp.

Agar extrait de sol : couverture blanche homogène.

Gélatine : n'est pas liquéfiée.

Lait tournesolé : acidifié.

Pomme de terre : couverture blanche.

Grandeur : 4,0-6,0 μ de long, 0,7-0,8 μ de large.

Spores : 1,6-1,8 μ de long, 0,6-1,0 μ de large.

Gram —.

5. *Clostridium album liquefaciens* n. sp.

Agar extrait de sol : colonies blanches, transparentes.

Gélatine : liquéfiée.

Lait tournesolé : acidifié.

Grandeur : 3,0-3,5 μ de long, 0,2-0,3 μ de large.

Gram —.

Spores : très grandes et ovales 2,0-2,2 μ de long, 1,0-1,2 μ de large.

Gram —.

6. *Clostridium album minor* n. sp.

Agar extrait de sol : colonies blanches à ramifications filamenteuses, irrégulières.

Gélatine : n'est pas liquéfiée.

Grandeur : 2,0-3,0 μ de long, 0,15-0,2 μ de large.

Spores : ovales 0,8-1,2 μ de large, 1,2-1,4 μ de long.

Gram —.

7. *Clostridium albo-lacteum* n. sp.

Agar extrait de sol : couverture blanche d'une lueur jaunâtre.

Gélatine : n'est pas liquéfiée.

Lait tournesolé : neutre.

Grandeur : 4,5-4,0 μ de long, 0,3-0,4 μ de large.

Spores : 1,0-1,2 μ de long, 0,8-1,0 μ de large, ovales.

Gram —.

8. *Clostridium hyalinum* n. sp.

Agar extrait de sol : couverture transparente, continue.

Gélatine : non liquéfiée.

Lait tournesolé : acidifié.

Grandeur : 2,0-2,5 μ de long, 0,3-0,4 μ de large.

Spores : ovales terminales 1,4-1,6 μ de long, 1,0-1,2 μ de large.

Gram —.

9. *Actinomyces purpureus* n. sp.

Agar extrait de sol et agar glucose : colonies rondes continues transparentes, rose pâle.

Gélatine : colonies gris-blanchâtre au début, roses dans la suite, qui communiquent cette couleur au milieu; n'est pas liquéfiée.

Lait tournesolé : neutre, coagule en formant un anneau rose.

Pomme de terre : mycélium aérien avec lueur vert-pâle; le milieu lui-même prend une teinte cramoisi pâle.

Hyphes : 0,1-0,2 μ de largeur.

10. *Actinomyces nigricans* n. sp.

Agar extrait de sol et agar glucose : colonies brun clair rondes, communiquant une couleur foncée au milieu après quelques jours, mycélium aérien blanc.

Gélatine : colonies blanches, brunes plus tard, n'est pas liquéfiée.

Lait tournesolé : acidifié.

Pomme de terre : colonies blanc-verdâtre avec mycélium aérien blanc, le milieu lui-même prend une teinte noire.

Hyphes : 0,2-0,3 μ de largeur.

11. *Actinomyces Saharæ* n. sp.

Agar extrait de sol et agar glucose : petites colonies denses, couleur faïence, devenant brun-rouille plus tard.

Gélatine : n'est pas liquéfiée.

Lait tournesolé : acidifié.

Pomme de terre : les colonies et le milieu prennent une couleur violet pâle.

Hyphes : 0,3-0,4 μ de large.

LISTE DES TRAVAUX UTILISÉS

- BERGEY. *Manual of Determinative Bacteriology*, London, 1934.
- Comptes rendus de la deuxième Commission de l'Association internationale de la science du sol, 1929.
- DUCLAUX. *Traité de Microbiologie*, 1901.
- ENGLER. *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, 1924-1935.
- FEHÉR (D.). *Untersuchungen über die Mikrobiologie des Waldbodens*. Springer, Berlin, 1933. (Contient une liste bibliographique complète.)
- FEHÉR (D.). Regionale Untersuchungen über den P_2O_5 -Gehalt der Waldböden. *Zeitschrift für Phosphorsäure*, 2, n° 12, 1932, p. 705-734.
- FEHÉR (D.). Regionale Untersuchungen über den Kaligehalt der Waldböden. *Zeitschrift f. Pflanzenernährung und Düngung*, 33, 1934, p. 320-335.
- FEHÉR (D.). Experimentelle Untersuchungen über den Einfluss von Temperatur und Wassergehalt des Bodens auf die Lebenserscheinungen der Bodenbakterien. *Archiv. f. Mikrobiologie*, 4, 1933, p. 447-486.
- FEHÉR (D.). Les principales lois régissant la vie du sol forestier. *Revue des Eaux et Forêts*, Nancy, 1935.
- GAUTHIER-LIÈVRE. *Recherches sur la flore des Eaux continentales de l'Algérie et de la Tunisie*, Alger, 1931.
- HARDER (R.). Ueber den Wasser- und Salzgehalt und die Saugkräfte einiger Wüstenböden Beni Unifs (Algerien). *Jb. wiss. Bot.*, 72, 1930, p. 665.
- HENRY. *Les sols forestiers*, 1912.
- LEHMANN et NEUMANN. *Bakteriologische Diagnostik*, 1927.
- LINDAU (G.). *Die mikroskopischen Pilze*, 1922.
- LINDAU (G.) et MELCHIOR (H.). *Die Algen*, 1926.
- MAIRE (R.). *Etudes sur la flore et la végétation du Sahara central*, 1933.
- NÈGRE (L.). Étude biologique de la flore bactérienne thermophile du Sahara. Barnéoud et Cl^e, Laval. *Thèse sc. Paris*, 1918.
- NOWAK (J.). *Documenta Microbiologica*, 1927.
- PASCHER. *Die Süßwasserflora*, 1914-1935 ;
Physique du sol. Édité par l'association internationale de la science du sol, 1926.

RABENHORST. *Kryptogamenflora*.

RIVKIND (L.). Études des terres du Sahara. *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie*, 7, 1929, p. 88.

RUSSEL. *The Microorganism of the Soil*, 1923.

SIEGRIST, Abrégé de l'analyse physique du sol, etc. (Comm. 9 de la S. I. G., M. A. Montpellier, 1930.

WAKSMAN (S. A.). *Principles of Soil Microbiology*. 1934.

Le Gérant : G. MASSON.

Paris. — A. MARETHEUX et L. PACTAT, imp., 1, rue Cassette. — 1935.